



# Physiopathologie des anomalies du développement alvéolaire dans le RCIU : approche expérimentale et clinique

Elodie Zana

## ► To cite this version:

Elodie Zana. Physiopathologie des anomalies du développement alvéolaire dans le RCIU : approche expérimentale et clinique. Biologie moléculaire. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T020 . tel-01060181

**HAL Id: tel-01060181**

**<https://theses.hal.science/tel-01060181>**

Submitted on 3 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Ecole doctorale Gc2iD

INSERM U1141

# Physiopathologie des anomalies du développement alvéolaire dans le RCIU

*Approche expérimentale et clinique*

Par Elodie Zana-Taïeb

Thèse de doctorat de Génétique, cellulaire, immunologie, infectiologie  
et développement

Dirigée par le Pr Pierre-Henri Jarreau

Présentée et soutenue publiquement le 8 juillet 2014

Devant un jury composé de :

Pr Olivier Claris –PU-PH

Président

Pr Michael Fayon – PU-PH

Rapporteur

Pr Delphine Mitanchez -PU-PH

Rapporteur

Dr Céline Méhats

Examineur

Pr Pierre-Henri Jarreau –PU-PH

Directeur de Thèse- Examineur

## Résumé

Une croissance intra-utérine insuffisante représente, avec la prématurité et les malformations congénitales, une des principales causes de morbidité et de mortalité néonatales. Ces pathologies sont liées entre elles, les nouveau-nés prématurés étant souvent atteints de RCIU (RCIU). Les études épidémiologiques récentes ont montré que le RCIU était associé à une augmentation de la morbidité respiratoire dès la période néonatale, avec, en particulier, une augmentation du risque de dysplasie broncho-pulmonaire (DBP), principale séquelle respiratoire de la prématurité. La DBP est caractérisée par des anomalies du développement alvéolaire et vasculaire, considérées comme les conséquences d'agressions multiples sur un poumon immature. La physiopathologie exacte reste encore largement méconnue. Nous nous sommes intéressés dans ce travail au lien entre RCIU et DBP avec un abord expérimental et clinique.

Alors que les études épidémiologiques sont relativement concordantes sur le lien entre RCIU et DBP, les études expérimentales, montrent des résultats divers tant sur le développement pulmonaire qu'au niveau moléculaire. Nous avons donc voulu identifier, dans un premier temps, un modèle de RCIU reproduisant les anomalies du développement alvéolaire observées chez l'Homme en utilisant trois modèles précédemment validés chez le rat : un modèle de restriction protidique per-gestationnelle, un modèle de ligature unilatérale de l'artère utérine, un modèle d'injection d'un inhibiteur chimique de la NO synthase, le L-NAME. Seule la restriction protidique anténatale permet de reproduire à long terme des lésions de l'alvéolisation proches de celles observées dans la DBP. En revanche, dans ce modèle, les modifications des principaux gènes identifiés précédemment dans les anomalies du développement alvéolaire ne sont pas observées, que ce soit avant, pendant ou après l'alvéolisation. Ce résultat nous a amené à entreprendre une étude multigénique qui a permis d'identifier plusieurs voies modifiées pendant l'alvéolisation dans ce modèle. Parmi celles-ci, les gènes impliqués dans la contractilité et l'adhésion cellulaire, l'immunité ou la voie des « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ».

Dans la partie clinique de cette étude, nous avons évalué le risque de DBP chez les extrêmes prématurés atteints de RCIU dont les mères présentaient des signes de pathologie vasculaire de la grossesse (prééclampsie). Cette étude rétrospective unicentrique sur 184 enfants a permis de comparer des enfants atteints de RCIU à des enfants eutrophes pris en charge de manière homogène. Le RCIU d'origine vasculaire multiplie le risque de DBP par 6. Un marqueur précoce de l'évolution vers une DBP est un taux de plaquettes bas à la naissance, évoquant le rôle d'un taux élevé de facteurs anti-angiogéniques circulants. Une étude est en cours pour corrélérer les facteurs anti-angiogéniques circulants présents chez les mères prééclamptiques au devenir respiratoire, en particulier à l'évolution vers une DBP, de leurs nouveau-nés d'âge gestationnel inférieur à 30 semaines d'aménorrhée.

En conclusion, nous avons montré expérimentalement que seule la restriction protidique anténatale chez le rat reproduisait les troubles de l'alvéolisation comparables à ceux observés dans la DBP. De nouvelles voies moléculaires potentiellement impliquées dans les anomalies de l'alvéolisation ont été mises en évidence. Par ailleurs, le rôle de facteurs anti-angiogéniques d'origine maternelle comme facteurs de développement d'une DBP est en cours d'évaluation.

**Title :**

Pathophysiology of alveolarization growth disorder due to intrauterine growth restriction.  
Clinical and experimental approach.

**Abstract :**

Insufficient intrauterine growth is with prematurity and congenital malformations, a major cause of neonatal morbidity and mortality. These conditions are interrelated, the preterm infants often suffered of intrauterine growth restriction (IUGR). Recent epidemiological studies showed that IUGR was associated with increased respiratory morbidity as soon as the neonatal period, with an increased risk of bronchopulmonary dysplasia (BPD), the main respiratory sequelae of prematurity. BPD is characterized by impaired alveolar and vascular development and is the consequence of multiple insults on an immature lung. The exact pathophysiology is still largely unknown. We study in this work the relationship between IUGR and DBP with an experimental and clinical approach.

While epidemiological studies are relatively concordant on the relationship between IUGR and BPD, experimental studies showed various results in lung development and molecular process. We wanted to identify, at first, a model of IUGR reproducing impaired alveolar development observed in humans using three previously validated models in rats: a model of per-gestational protein restriction, a model of unilateral ligation uterine artery, an injection pattern of a chemical inhibitor of NO synthase, L NAME. Only antenatal protein restriction can reproduce long-term impaired alveolarization as those observed in BPD. However, in this model, changes in key genes previously identified in pathological alveolar development are not observed before, during or after alveolarization. This result led us to perform a genome-wide analysis which identified several modified pathways during alveolarization. Among these, the genes involved in the "cardiac contractility", "cell adhesion molecules", "immunity", "molecular adhesion" or the "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor" pathways.

In the clinical part of this study, we evaluated the risk of BPD in extreme preterm infants with IUGR whose mothers had evidence of vascular disease of pregnancy (preeclampsia). This single-center retrospective study of 184 children was used to compare children with IUGR in adjusted for gestational age children. The vascular IUGR increases the risk of DBP by 6. An early marker of progression to BPD is a low platelet count at birth, referring to the role of high levels of circulating anti-angiogenic factors. A study is ongoing to correlate circulating anti-angiogenic factors present in preeclamptic mothers to respiratory outcome and particularly BDP, in newborn younger than 30 weeks of gestational age at birth.

In conclusion, we have shown experimentally that only prenatal protein restriction in rats reproduced impaired alveolarization comparable to those observed in the BPD. New molecular pathways potentially involved in the impaired alveolarization were highlighted. Moreover, the role of placental anti-angiogenic factors leading to development of BPD is evaluated.

**Mots clés (français) :**

Anomalies de l'alvéolisation

Dysplasie Broncho-Pulmonaire

Prééclampsie

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

Puces d'expression à ARN

Retard de Croissance Intra-Utérin

**Keywords :**

Bronchopulmonary dysplasia

Chronic lung disease

Impaired alveolarization

Intrauterine growth restriction

Microarray analysis

Preeclampsia

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

## Liste des abréviations

ADM: Adrénomedulline

Aldh-1 :aldéhyde déshydrogénase

ARNm : Acides messagers ribonucléiques

CTRL: Contrôles

DBP: Dysplasie broncho-pulmonaire

DHA : Acide Docosaénoïque

E: Jour de vie embryonnaire

FGF: Fibroblast growth factor

FiO<sub>2</sub>: Fraction inspirée d'oxygène

Fox: Forkhead box

GATA-6: GATA-binding factor 6

GM-CSF: Granulocyte Monocyte- colony Stimulating Factor

HIV: hémorragie intra-ventriculaire

IGF : Insulin Growth Factor

IRM: imagerie par resonance magnétique

KO: Knock-out

L-NAME: N omega-nitro-L-arginine methyl ester

LPD: Régime hypoprotidique

MDI : Mental Developmental Index

MLI: Mean linear intercept

MMP: Matrix metalloprotease

NOS: Nitric oxide synthase

P: Jour de vie post-natale

PECAM : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1

PDGF-A: Platelet derived growth factor

PDI : Psychomotor Index

PFA: Paraformaldehyde

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PTHrP : Parathyroid Related Hormone-Related Peptide

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

RAC: Compte radial alvéolaire

Raldh-2 : rétinaldéhyde déshydrogénase 2

RAR : Récepteur de l'acide rétinoïque

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

RXR : Récepteur X de l'acide rétinoïque

TGF : Transforming Growth Factor

Sa: Surface alvéolaire

sFlt-1 : soluble fms-like tyrosine kinase-1=VEGFR-1

SGA : small for gestational age

SP- : protéines du surfactant

SPOCK 2 : SPARC/osteonectin, CWCV and Kazal-like domains proteoglycan 2

Sv(a,p): Densité de surface alvéolaire

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Wnt :Wingless-type MMTV integration site family

*« On ne peut donner que deux choses à ses enfants : des racines et des ailes »*

Proverbe

*A Abigail et Samuel*

*A mes parents*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement les Professeurs Michael Fayon et Delphine Mitanchez qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Professeur Olivier Claris, Président du jury, qui malgré un emploi du temps excessivement chargé a trouvé le temps de présider cette Thèse. Merci à Celine Méhats, examinatrice, qui a su susciter et entretenir mon goût pour la Recherche. Je remercie chacun d'entre eux de m'avoir fait l'honneur de lire et de juger ce travail.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Professeur Pierre-Henri Jarreau, qui m'encadre ou plutôt « me supporte » depuis maintenant sept ans, du Master recherche à la Thèse de sciences ainsi qu'au quotidien dans le service de Médecine et Réanimation néonatales qu'il dirige. Je le remercie pour la qualité de son encadrement, pour nos échanges, pour tous les projets qu'il m'a confié, en espérant être à la hauteur de la tâche....

Merci également à Marie-Laure Franco Montoya à qui je dois beaucoup et sans qui la majeure partie de ce travail n'aurait pas existé. Un grand merci également à Daniel Vaiman pour son encadrement et les discussions qui vont avec, toujours enrichissantes à de nombreux points de vue. Merci également à Olivier B pour son enthousiasme et son accompagnement depuis de nombreuses années, j'espère que la collaboration se poursuivra longtemps encore

Merci également à l'équipe PremUp pour son soutien logistique et à la Fondation Air Liquide de m'avoir accordé sa confiance et son soutien.

Merci à Alice dont le parcours sans faute est source d'inspiration ...

Merci à Marie-Stéphanie, Charlotte, Marianne, Gaëlle, Juliana, Jean-Françoise, Mayass et les autres de m'avoir supporté ces dernières années de Thèse avec mes « manips » ...

## Table des matières

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>8</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>13</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETAT DES CONNAISSANCES</b>	<b>14</b>
<b>Chapitre 1 : Développement pulmonaire normal</b>	<b>14</b>
I- Différents stades du développement pulmonaire normal	14
1) Stade embryonnaire	14
2) Stade pseudo-glandulaire	15
3) Stade canaliculaire	15
4) Stade sacculaire (26 <sup>ème</sup> à 36 <sup>ème</sup> semaine)	16
5) Stade alvéolaire	16
II- Evaluation du développement pulmonaire normal : méthodes quantitatives	17
1) Morphométrie pulmonaire	17
a) Estimation de la densité de volume	18
b) Estimation de la densité de surface	18
2) Compte radial alvéolaire	18
c) Mécanismes moléculaires indispensables à un développement pulmonaire normal	18
1) L'élastogenèse est indispensable à la septation alvéolaire	19
2) Rôle des fibroblasts growth factor	21
3) Remodelage de la matrice extracellulaire	22
4) Prolifération et différenciation épithéliale	23
5) Angiogenèse	23
6) La formation des alvéoles est sous la balance des acides rétinoïques et des glucocorticoïdes	25
<b>Chapitre 2 : Dysplasie Broncho-Pulmonaire</b>	<b>26</b>
I- Définition	26
II- Epidémiologie	27
III- Description lésionnelle et physiopathologie	28
IV- Facteurs de risque identifiés par les études épidémiologiques	29
V- Susceptibilité génétique	30
VI- DBP : l'hypothèse vasculaire	30
VII- Modèles animaux de DBP	31
1) Hyperoxie	31
2) Inflammation anténatale	32
3) Inflammation post-natale	33
<b>Chapitre 3 : Croissance et retard de croissance</b>	<b>33</b>
I- Définitions	34
II- Diagnostic étiologique	35
1) La prééclampsie : étiologie la plus fréquente de RCIU	36
2) Prééclampsie : rôle des facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques	37
III- Prise en charge d'un enfant avec un RCIU	39
1) Taux de mortalité	39
2) Conséquences néonatales immédiates du RCIU	40
a) Complications respiratoires	40
b) Conséquences neurologiques	40

c) Conséquences digestives	40
d) Conséquences métaboliques	41
e) Conséquences hématologiques	41
f) Conséquences infectieuses	41
3) Conséquences à long terme	42
a) Conséquences neurologiques	42
b) Conséquences métaboliques	44
IV- RCIU : modèles animaux	44
1) Espèces animales couramment utilisées pour le RCIU	44
2) Modèles Nutritionnels	45
a) Restriction nutritionnelle globale	45
b) Restriction calorique	45
c) Restriction protidique	46
d) Déficit en fer	47
e) « Over-feeding » chez des brebis gestantes	47
3) Modèles vasculaires chirurgicaux et médicamenteux	47
a) Ligature bilatérale de l'artère utérine	47
b) Ligature unilatérale de l'artère utérine	47
c) Embolisation ombilico-placentaire	48
d) Embolisation de l'artère ombilicale	48
e) Caronculectomie	48
f) Restriction de croissance par administration d'un inhibiteur de la NO synthase : le L-NAME	48
4) Autres modèles	49
a) Hypoxie gestationnelle	49
b) Stress maternel	49
c) Restriction de croissance par injection de glucocorticoïdes	49
<b>Chapitre 4 : RCIU, maturation et développement pulmonaire</b>	<b>49</b>
I- Conséquences à court terme : surfactant et maladie des membranes hyalines	50
1) Les dopplers intra-utérins ont-ils un caractère prédictif de la fonction pulmonaire en cas de pathologie maternelle vasculaire ?	51
2) Evaluation biologique de la maturation du surfactant : rapport Lécithine / Sphingomyéline ou comptage des corps lamellaires	51
3) Corticothérapie anténatale pour RCIU	51
4) Chez l'animal	52
II- Conséquences à moyen terme : anomalies de l'alvéolisation et DBP	52
1) Epidémiologie chez l'Homme	52
2) Chez l'animal	53
a) Analyse morphométrique chez le mouton	53
b) Etude de la morphométrie pulmonaire chez le rat	54
c) Voies aériennes	54
d) Mécanismes moléculaires	55
i) Anomalies de la synthèse d'élastine	55
ii) Etude des phénomènes apoptotiques	55
iii) Importance du VEGF et de son récepteur soluble circulant VEGFR-1 (sFlt-1)	56
iv) Approche de type gène-candidat	56
c) Epreuves fonctionnelles respiratoires	56
d) Essais thérapeutiques pré-cliniques	57
III- Conséquences à long terme : homme et animal	57
1) Chez l'Homme	57
2) Chez l'animal: Etude de la morphométrie et de la fonction pulmonaires	58

<b>PARTIE 2 : OBJECTIFS ET CONCEPTION DE L'ETUDE</b>	<b>59</b>
I- Etude fondamentale	59
II- Approche clinique	60
1) Hypothèse et objectifs	61
a) Hypothèse principale	61
b) Objectifs :	61
2) Modalités pratiques	61
a) Prélèvements	61
b) Dosages et méthodes de dosage	62
3) Confrontation entre les données biologiques et cliniques	62
a) Base de données	62
b) Critères d'inclusion et de non-inclusion	62
c) Nombre de sujets nécessaires et analyse statistique	62
<b>PARTIE 3: RESULTATS</b>	<b>63</b>
<b>PARTIE 4: DISCUSSION GENERALE, RESULTATS COMPLEMENTAIRES, PERSPECTIVES</b>	<b>115</b>
I- Choix des modèles : sélection du modèle restriction protidique	115
II- Absence de modification des facteurs de croissance impliqués dans le développement pulmonaire post-natal	117
III- Etude des variations de la voie PPAR au cours du développement alvéolaire en cas de RCIU induit par restriction protidique	118
1) PPAR : généralités	119
2) PPAR et poumon	121
3) Quel rôle spécifique pour PPAR $\alpha$ dans le poumon ?	123
<b>CONCLUSION</b>	<b>126</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>127</b>

## Table des illustrations

<b>FIGURE 1 :</b> COUPES HISTOLOGIQUES DES POUMONS DANS LE MODELE « LIGATURE UNILATERALE DE L'ARTERE UTERINE » A P4, P10 ET P21. GROSSISSEMENT X20.....	117
<b>FIGURE2:</b> METHYLATION DES PROMOTEURS DES GENES FABP3 ET PPARY A P4 ET P10 .....	123
<b>FIGURE 3:</b> IMMUNOHISTOCHEMIE PPARA SUR POUMONS A P10. A ET B : POUMONS D'ANIMAUX RCIU. C ET D : POUMONS D'ANIMAUX TEMOINS.....	125

## Introduction

---

Une croissance intra-utérine insuffisante représente avec la prématurité, les malformations congénitales et l'asphyxie périnatale une des principales causes de morbidité et de mortalité néonatales. Ces différentes pathologies sont liées entre elles : les nouveau-nés prématurés sont souvent atteints de RCIU (RCIU) ; les fœtus RCIU naissent plus souvent dans des conditions d'asphyxie que les fœtus eutrophes et les fœtus malformés sont souvent atteints de RCIU. Un fœtus atteint de RCIU est un fœtus pour lequel la croissance observée est inférieure à la croissance attendue.

Les études épidémiologiques récentes ont montré que le RCIU était associé à une augmentation de la morbidité respiratoire qui débute en période néonatale avec une augmentation du risque de dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) et se prolonge pendant l'enfance et à l'âge adulte avec des anomalies des épreuves fonctionnelles respiratoires. La DBP constitue la principale séquelle respiratoire de la prématurité. Elle est liée à la survenue d'agressions multiples sur un poumon immature. Elle correspond à un arrêt du développement alvéolaire avec une diminution de la septation secondaire et de la vascularisation, sans fibrose marquée dans sa forme actuelle. Le résultat est une diminution du nombre total d'alvéoles avec une diminution de la surface d'échange gazeux (Jobe and Bancalari 2001).

Alors que les études épidémiologiques sont relativement concordantes, les résultats des études animales s'intéressant aux conséquences du RCIU sur le développement pulmonaire sont à ce jour, contradictoires avec des troubles de l'alvéolisation variables d'une étude à l'autre. Les mécanismes moléculaires conduisant aux anomalies de l'alvéolisation sont également mal compris et peu explorés, que ce soit dans les études animales ou chez l'Homme. Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de ces troubles de l'alvéolisation secondaires à un RCIU et de pouvoir proposer des thérapeutiques innovantes, de nouveaux axes de recherche clinique et fondamentale apparaissent nécessaires.

## Première partie : Etat des connaissances

---

### Chapitre 1 : Développement pulmonaire normal

Le développement pulmonaire commence dès le 28<sup>ème</sup> jour de grossesse et prend fin vers 18 ou 24 mois post-natal. Il est divisé en cinq stades : embryonnaire, pseudo-glandulaire, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire. La formation de l'arbre trachéo-bronchique par « branching » ou division dichotomique a lieu au cours des deux premiers stades et la mise en place du poumon distal débute au stade canaliculaire.

#### I-Différents stades du développement pulmonaire normal

##### 1) *Stade embryonnaire*

Embryologiquement, le poumon dérive de l'intestin primitif. Cependant, il y a des différences structurelles entre l'intestin et le poumon au regard de leur innervation et de leurs cellules endocriniennes. Le développement pulmonaire commence au 28<sup>ème</sup> jour de grossesse comme une évagination de l'intestin primitif. Deux bourgeons apparaissent ensuite et chacun d'eux forme un système asymétrique de division. L'ensemble forme le système pulmonaire primordial (Ten Have-Opbroek 1981). Les bourgeons sont à l'origine de l'ensemble des cellules épithéliales du poumon mature alors que le mésenchyme environnant va donner naissance à tous les autres types cellulaires présents dans le poumon (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses). Les vaisseaux apparaissent de façon parallèle. Ils sont issus des artères pulmonaires provenant du sixième arc aortique, du réseau capillaire pulmonaire qui se développe à partir du mésenchyme au contact du bourgeon épithélial et des veines pulmonaires. Les réseaux vasculaires se connectent entre eux à partir du 34<sup>ème</sup> jour de grossesse. Le développement vasculaire implique un processus de « vasculogénèse » qui correspond à la création de nouveaux vaisseaux à partir de la différenciation de cellules endothéliales au sein du mésenchyme et un processus « d'angiogénèse » qui correspond au bourgeonnement et à la ramification des vaisseaux préexistants. Deux théories s'opposent quant au rôle respectif de l'un et l'autre (Parera, van Dooren et al. 2005). L'une suggère que la vasculoge-

nèse est le phénomène primitif alors que l'autre suggère la coexistence des deux phénomènes. Les études récentes plaident en faveur de la deuxième hypothèse avec par exemple l'intervention précoce de l'angiogenèse dans le développement des veines pulmonaires (Hall, Hislop et al. 2002).

### *2) Stade pseudo-glandulaire*

Durant cette période, le poumon passe d'un système primordial indifférencié à un système bronchique et respiratoire. Ce stade se déroule entre la 7<sup>ème</sup> et la 16<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Au début du stade pseudo-glandulaire, les cellules constituent des tubules tapissés par un épithélium cylindrique haut et indifférencié dispersés dans un mésenchyme abondant. Chacune des extrémités bronchiolaires est à l'origine d'une unité fonctionnelle pulmonaire : l'acinus. Le développement vasculaire se poursuit avec l'apparition des artères et veines pré-acinaires par des phénomènes de vasculogenèse et angiogenèse.

Les cellules situées dans les voies de conduction aériennes commencent à se différencier dès ce stade en cellules ciliées et en cellules caliciformes. Le mésenchyme se différencie en muscle lisse à partir de 7 semaines. Le cartilage apparaît à ce stade et se développe sur le même schéma. (Kitaoka, Burri, 1996).

Les unités respiratoires se développent aux stades pseudo-glandulaire tardif, canaliculaire, sacculaire et alvéolaire.

### *3) Stade canaliculaire*

Il se déroule entre les 16<sup>ème</sup> et 26<sup>ème</sup> semaines. Les bronchioles terminales donnent naissance au cours de ce stade aux canalicules ou aux tubules et au parenchyme pulmonaire. L'élément marquant de ce stade est la modification de l'épithélium et du mésenchyme environnant avec l'apparition d'une démarcation très nette entre les cellules des futures voies aériennes qui conservent un aspect cylindrique et les cellules des régions d'échanges gazeux qui acquièrent un épithélium cuboïdal.

Les premières inclusions lamellaires apparaissent vers 19 semaines. La lumière des tubules s'élargit et une partie des cellules épithéliales s'aplatit. A partir de 24 semaines, des pneumocytes de type I ou II plus ou moins matures peuvent être distingués (Merkus, 1996) avec des pneumocytes de type II cubiques qui se différencient en pneumocytes de type I pavimenteux.



Un autre changement majeur de cette période est le développement de la circulation pulmonaire distale. Un réseau capillaire se forme autour des passages aériens distaux. Certains capillaires font protrusion à travers l'épithélium séparé par une couche de lamina basale. La surface d'échanges gazeux devient de plus en plus fine avec une épaisseur de  $0,2\mu\text{m}$  à la fin du stade canaliculaire. Le lit vasculaire continue de croître par angiogenèse.

#### 4) *Stade sacculaire (26<sup>ème</sup> à 36<sup>ème</sup> semaine)*

Des grappes de sacs alvéolaires se forment au niveau des parties terminales de l'arbre respiratoire. A l'extrémité distale de chaque division terminale se trouvent ces sacs alvéolaires aux parois lisses tapissées par des pneumocytes de type I et II. Les septas entre les sacs alvéolaires sont encore épais à ce stade et contiennent les réseaux capillaires des deux sacs voisins. La matrice des septas est composée de fibres de collagène et de fibres élastiques qui sont encore rares. Elle joue un rôle clé dans la croissance et la différenciation de l'épithélium sus-jacent. A la fin de ce stade, les fibroblastes interstitiels commencent à produire du matériel extra-cellulaire dans l'espace inter-sacculaire. L'épithélium initialement cuboïdal s'amincit pour devenir pavimenteux. La sécrétion de surfactant augmente. Le développement vasculaire se poursuit.

#### 5) *Stade alvéolaire*

Au cours des dernières semaines de grossesse, des nouveaux sacs alvéolaires se forment donnant naissance simultanément aux premières alvéoles. Le parenchyme formant les septa primaires entre les sacs alvéolaires est constitué par une double épaisseur de capillaires. La formation des alvéoles matures comprend deux phases successives : la septation secondaire et la maturation micro-vasculaire. La septation secondaire correspond à la subdivision des saccules primitifs par l'apparition des nouvelles cloisons inter-alvéolaires. Des dépôts d'élastine, synthétisée par les myofibroblastes, s'accumulent dans l'épaisseur des *septa* primaires entre les deux réseaux de capillaires et « entraînent » la paroi pour former perpendiculairement les *septa* secondaires, l'élastine se retrouvant alors à l'apex des *septa*. La seconde phase, qui marque la fin du processus d'alvéolisation, est caractérisée par l'amincissement des *septa* primaires et secondaires (par apoptose des fibroblastes et réduction du volume du tissu interstitiel), et par la fusion du double réseau capillaire en un réseau unique (maturation micro-vasculaire).

Ce stade permet à la fois d'augmenter considérablement la surface des échanges gazeux et d'optimiser la diffusion des gaz de part et d'autre de la barrière air/sang. Le processus d'alvéolisation est un phénomène essentiellement postnatal chez l'humain et se termine vraisemblablement entre 18 et 24 mois (Langston, Kida et al. 1984, Zeltner, Caduff et al. 1987). Cependant, la formation de nouvelles alvéoles peut avoir lieu plus tard dans l'enfance voire même chez l'adulte, on parle alors « d'alvéolisation tardive » (Burri 2006). De même, la formation de nouvelles alvéoles a été observée après une résection pulmonaire chez la souris, témoignant d'une croissance compensatrice possible par augmentation du nombre d'alvéoles et non par augmentation de volume des alvéoles préexistantes ; on parle dans ce cas de « néo-alvéolisation » (Fehrenbach, Voswinckel et al. 2008). Une diminution des apports caloriques de 33% diminue le nombre d'alvéoles de 55% (par perte ou par destruction) et de la surface alvéolaire de 25%. Cette perte alvéolaire est accompagnée d'une augmentation de l'apoptose et d'une perte d'ADN dans les parois alvéolaires (Massaro, Radaeva et al. 2002). L'accès à la nourriture *ad libitum* provoque une régénération des alvéoles avec une augmentation des niveaux d'expression de RNA une heure seulement après la reprise de l'alimentation (Massaro, Alexander et al. 2007).

## II- Evaluation du développement pulmonaire normal : méthodes quantitatives

### 1) Morphométrie pulmonaire

Des données quantitatives sont indispensables pour établir une relation solide entre structure et fonction. En effet, pour assurer une oxygénation convenable, la molécule d'oxygène doit franchir plusieurs barrières qui offrent une résistance d'autant plus grande que la distance à franchir est longue. D'autre part, plus la superficie des barrières est grande, plus le nombre de molécules pouvant la franchir simultanément est grand. C'est grâce à ces considérations que Weibel publia en 1970-1971 son modèle de capacité de diffusion pulmonaire morphométrique (Weibel and Cruz-Orive 1997). La morphométrie dans son sens le plus large comprend toutes les formes de mesures servant à établir les dimensions des structures (Bron C 2007). Pour obtenir une analyse stéréologique complète de la capacité d'échanges gazeux pulmonaires, le volume pulmonaire total ainsi que celui de ses compartiments respectifs est indispensable. Une fois le poumon isolé, la meilleure méthode pour en obtenir le volume est la méthode d'immersion basée sur le principe de la poussée d'Archimède (Bron C 2007).

Il est généralement admis que le parenchyme pulmonaire des petites espèces est plus ou moins homogène en comparaison des poumons entiers ou de plus grandes dimensions.

#### a) Estimation de la densité de volume

La fraction de volume ou densité de volume d'une fraction d'une composante « i » dans un volume déterminé s'obtient directement à partir de la densité de surface qui, elle, correspond à la fraction de la surface totale occupée par la composante « i » sur la coupe. Cette fraction de surface peut être obtenue par un comptage de points grâce la superposition d'un ensemble de points et en établissant le quotient entre le nombre de points totaux et ceux se superposant à la surface d'intérêt (Bron C 2007).

#### b) Estimation de la densité de surface

La densité de surface est proportionnelle au nombre d'intersection entre un système de ligne et les contours des éléments à mesurer divisé par la longueur totale des lignes du réseau stéréologique superposé (Bron C 2007).

### 2) *Compte radial alvéolaire*

L'unité respiratoire terminale pulmonaire est la masse des espaces aériens distaux au-delà d'une bronchiole respiratoire terminale, le fond de ce tube étant bordé par un épithélium. Plusieurs méthodes d'évaluation ont été proposées mais la seule qui présente une reproductibilité satisfaisante consiste à ignorer toutes les bronchioles complètement bordées par un épithélium bronchique et à ne considérer que celles bordées partiellement par cet épithélium. En partant du centre d'une unité respiratoire terminale, une ligne perpendiculaire doit être dessinée jusqu'au tissu connectif le plus proche. Le nombre d'alvéoles coupant cette ligne doit être compté. (Emery and Mithal 1960). Cooney *et al* ont montré que le compte radial alvéolaire était étroitement corrélé à l'âge gestationnel, à la longueur crânio-caudale, au poids de naissance mais aussi au volume pulmonaire (Cooney TP 1982).

#### c) Mécanismes moléculaires indispensables à un développement pulmonaire normal

Les molécules interviennent à différents moments bien spécifiques au cours de l'alvéolisation. Les études ont été réalisées avec une approche principalement de type « gène candidat » utilisant des modèles de KO inductible comme pour le PDGF-A, les récepteurs des Fibroblast Growth Factor (FGF), la MMP14 ou une inhibition spécifique comme pour le

VEGFR-2 ou l'adrénomédulline. Ces modèles peuvent être couplés ou non à un stress post-natal comme l'hyperoxie.

Les molécules testées font partie de différentes voies comme la prolifération cellulaire, les processus inflammatoires et fibrotiques, le stress oxydatif, l'infection ou le développement micro vasculaire (Bourbon, Boucherat et al. 2005).

#### *1) L'élastogénèse est indispensable à la septation alvéolaire*

Pour fournir une surface d'échanges gazeux suffisante, le tissu pulmonaire connaît une croissance extraordinaire ainsi qu'un remodelage. La formation des nouvelles parois inter-alvéolaires correspond à la septation. Parmi les nombreux facteurs participant au bourgeonnement des *septa*, le dépôt d'élastine dans l'épaisseur des *septa* primaires a un rôle fondamental.

**L'élastine** est élaborée par l'association d'un précurseur soluble, la tropo-élastine sous l'action d'une enzyme, la lysyl-oxidase. L'inhibition de cette enzyme chez le rat (Kida and Thurlbeck 1980) ou son invalidation chez la souris (Maki, Sormunen et al. 2005) aboutissent à des altérations irréversibles de l'architecture pulmonaire avec des espaces distaux élargis et une réduction du nombre de *septa*. La formation des fibres élastiques commence par la synthèse et l'organisation dans l'espace extra-cellulaire de glycoprotéines de structure : fibrillines, fibulines, émilines et « micro-fibrillar-associated glycoprotein ». Ces glycoprotéines de structure constituent une charpente sur laquelle vont se déposer les molécules de tropo-élastine. Ces molécules sont produites par les cellules interstitielles qui expriment l'actine musculaire lisse : les myofibroblastes. Les poumons de souris dépourvus d'élastine se développent jusqu'au stade sacculaire et ils présentent des sacs aériens dilatés avec une diminution du tissu septal équivalent à des poumons emphysémateux (Wendel, Taylor et al. 2000). Cependant, les conséquences sur la septation secondaire sont impossibles à évaluer dans ce modèle car les souris décèdent au quatrième jour de vie post-natale.

La nécessité d'un dépôt d'élastine et la migration des myofibroblastes vers les espaces aériens distaux a également été mise en évidence par l'invalidation du gène du **Platelet Derived Growth Factor- A** sécrété par les cellules épithéliales. Le KO PDGF-A/- induit chez des souris entraîne la perte des myofibroblastes alvéolaires et l'absence de dépôt de fibres d'élastine secondaire conduisant à des poumons emphysémateux. La perte des myofibroblastes est limitée au tissu parenchymateux alors que les tissus bronchique et vasculaire, composés également d'élastine sont bien présents témoignant de la spécificité du blocage de

l'élastogénèse septale (Bostrom, Willetts et al. 1996). Des souriceaux nouveau-nés ayant reçu par voie injectable un inhibiteur du récepteur du PDGF-A de P1 à P7 montrent des dépôts d'élastine désorganisés et un échec complet de la septation secondaire ayant comme résultat des alvéoles élargies, simplifiées qui persistent à l'âge adulte (Lau, Masood et al. 2011). Le PDGF-A aurait un pouvoir chémo-attractant sur les myofibroblastes.

**Le Transforming Growth Factor  $\beta$**  (TGF-  $\beta$ ) et ses dérivés sont fortement impliqués dans plusieurs étapes du développement pulmonaire et leur rôle est complexe et contrasté. Cette super- famille de facteurs de croissance contrôle la prolifération, la transformation et l'apoptose de différents types cellulaires et le dépôt et le remodelage de composants de la matrice extracellulaire (Morty, Konigshoff et al. 2009). Les trois isoformes du TGF-  $\beta$  et ses récepteurs sont exprimés dès la phase embryonnaire dans le poumon de rongeurs.

Lors du « branching », un excès de TGF- $\beta$ 1 empêche un développement pulmonaire normal en réduisant le « branching » *in vitro* et conduit à un élargissement des espaces distaux avec une fibrose interstitielle (Gauldie, Galt et al. 2003). A l'inverse, l'inhibition des médiateurs du TGF-  $\beta$  (Smad) grâce à l'ajout d'oligonucléotides antisens dans des cultures de poumon fœtal de souris, augmente le « branching » observé *in vitro* (Morty, Konigshoff et al. 2009).

Pendant l'alvéolisation, le TGF-  $\beta$ 1 contrôle également la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Il stimule la production d'actine musculaire lisse ( $\alpha$ SMA) des fibroblastes en culture (Hashimoto, Gon et al. 2001). L'expression du TGF- $\beta$ 1 et de son récepteur augmentent juste avant l'alvéolisation chez le rat (Buckley and Warburton 2002, Alejandre-Alcazar, Michiels-Corsten et al. 2008 ). La surexpression du TGF- $\beta$  par l'intermédiaire d'un adénovirus ou par surexpression conditionnelle du gène entre J7 et J14 de vie chez la souris (période d'alvéolisation) perturbe le développement alvéolaire avec des anomalies observées semblables à celles de la DBP (Morty, Konigshoff et al. 2009). Les souris invalidées pour le gène Smad3, acteur cytoplasmique de la transduction du signal induit par le TGF- $\beta$ 1 ont un retard l'alvéolisation et une diminution de l'expression de la tropo-élastine (Bonniaud, Kolb et al. 2004).

La suppression sélective de l'expression du récepteur au TGF- $\beta$ 2 à la surface des cellules épithéliales pulmonaires a été associée avec un retard d'alvéolisation avec une nette diminution des pneumocytes de type II (Chen, Zhuang et al. 2008).

## 2) Rôle des fibroblasts growth factor

La **famille des FGFs** et de leurs 4 récepteurs intervient à différentes étapes du développement pulmonaire. Ils sont exprimés dans le mésenchyme du poumon en développement (Peters, Werner et al. 1994). Les FGFs sont des régulateurs importants de processus essentiels du développement pulmonaire comme la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation (Cardoso, Itoh et al. 1997). Alors que les quatre récepteurs sont exprimés dès la phase embryonnaire tardive et ce jusqu'à la période post-natale précoce, les ARNm des FGF-R2, 3 et 4 ont une expression maximale dans l'épithélium alvéolaire durant l'alvéolisation post-natale (Powell, Wang et al. 1998). La perturbation de la voie de FGF-R2 dans l'épithélium des voies aériennes durant la formation du bourgeon pulmonaire résulte en un échec complet du « branching » (Peters, Werner et al. 1994).

L'expression des **FGF-R3** et **-R4** débute dès la vie anténatale et se poursuit en période post-natale avec un pic d'expression d'ARNm à P10 (Powell, Wang et al. 1998). L'analyse de la localisation de ces deux facteurs en hybridation *in situ* montre leur expression au niveau des cellules alvéolaires (Weinstein, Xu et al. 1998). Les souris porteuses d'un double KO FGF-R3 et FGF-R4 n'ont plus de septation alvéolaire alors qu'un seul KO n'induit pas d'anomalie de la septation (Weinstein, Xu et al. 1998). Dans ce modèle, il existe des dépôts d'élastine dans l'épaisseur des *septa* primaires mais ils ne permettent pas l'apparition des *septa* secondaires. L'exposition des ratons à une période d'hyperoxie allant de P0 à P6 induit des troubles de l'alvéolisation associés à une diminution de l'expression des FGF-R3, FGF-R4 et FGF18. L'étude comparative, par puces d'expression d'ARN de gènes dans des fibroblastes pulmonaires extraits à différents temps puis mis en culture, confirme les modifications d'expression dans le temps de FGF-R3 et -R4. Leur expression augmente entre P2 et P7 puis diminue entre P7 et P21 (Boucherat, Franco-Montoya et al. 2007).

Le **FGF7**, encore appelé keratinocyte growth factor (KGF) est synthétisé par les fibroblastes et a un effet prolifératif sur les cellules épithéliales tout en favorisant la réparation des lésions épithéliales avec un effet dose dépendant (Franco-Montoya, Bourbon et al. 2009). Le FGF7 est un puissant stimulant de la synthèse de surfactant et permet la maturation des pneumocytes de type II (Chelly, Mouhieddine-Gueddiche et al. 1999). Dans le poumon en période post-natale immédiate, FGF7 est localisé dans l'épithélium des voies aériennes et alvéolaires ainsi que dans le mésenchyme entourant la micro-vasculature pulmonaire (Padela, Yi et al. 2008). Cependant, l'administration de FGF7 à des ratons en hyperoxie ne permet pas de restaurer une alvéolisation comparable à celle des témoins. Chez le prématuré, des taux

élevés de FGF7 dans les effluents trachéaux les premiers jours de vie sont associés à une diminution du risque de DBP (Danan, Franco et al. 2002).

Le **FGF18** est exprimé par les fibroblastes et son expression postnatale est parallèle à celle de l'élastine. Ceci est hautement suggestif d'un rôle de ce facteur dans l'élastogenèse pulmonaire. L'administration de FGF18 recombinant dans des fibroblastes d'origine pulmonaire en culture stimule leur prolifération avec un effet dose réponse (Chailley-Heu, Boucherat et al. 2005) mais également la synthèse de lysyl-oxidase et de ligands de l'élastine comme les fibulines 1 et 5 (Chailley-Heu, Boucherat et al. 2005). L'étude des cibles du FGF18 a été réalisée sur poumons entiers en avançant le pic de FGF18 de E19 à P2 au lieu de P4 à P12. Cette étude montre que le FGF18 participe également à la régulation de l'angiogenèse en stimulant notamment la production d'adrénomédulline (x6.9) (Franco-Montoya, Boucherat et al. 2011).

### *3) Remodelage de la matrice extracellulaire*

Au cours du stade alvéolaire, des molécules de la matrice extracellulaire se déposent et parmi elles, des molécules de collagène (Thibeault, Mabry et al. 2003), de la fibronectine (Plumb, Dubaybo et al. 1987), de la laminine (Nguyen, Kelley et al. 2005) et des protéoglycanes (Wang, Sakamoto et al. 2002). Le renouvellement de la matrice extracellulaire est indispensable au bon déroulement de l'alvéolisation. Ainsi, jusqu'à 40% du collagène nouvellement synthétisé est dégradé en quelques heures durant l'alvéologénèse chez le rat nouveau-né (Arden and Adamson 1992).

Ce remodelage est essentiellement effectué par les métalloprotéases de la matrice (MMP) capables de dégrader l'ensemble des constituants de celle-ci. Deux protéases semblent cruciales dans le développement pulmonaire : **la MMP14 (MT1-MMP)** et la **MMP2**. L'inactivation du gène de la MMP14 dans un modèle murin provoque des anomalies de l'alvéolisation comparable à celles observées dans la DBP (Atkinson, Holmbeck et al. 2005) à savoir une diminution de la surface alvéolaire totale. En outre, l'expression des ARNm dans les fibroblastes, est multipliée par 3 ou 4 à P3, et reste élevée jusqu'à P8 puis diminue jusqu'à retourner au niveau prénatal vers P16 (Boucherat, Franco-Montoya et al. 2007), coïncidant avec la phase d'alvéolisation.

En ce qui concerne la **MMP16 (MT3-MMP)** des preuves cliniques et expérimentales viennent appuyer son rôle. Les génotypes rs2664352 et rs2664349 correspondant à des Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) sur le gène de la MMP16 sont protecteurs vis-à-vis de la DBP après ajustement pour le poids de naissance et l'origine ethnique. Dans ces génotypes, le

taux de MMP16 dans les effluents trachéaux 3 jours après la naissance est diminué d'un facteur 3. L'expression en ARNm de MMP16 varie peu jusqu'à P1 puis augmente graduellement jusqu'à P14 où l'expression est 5 fois plus importante qu'en période prénatale. L'expression de MMP16 est diminuée dans des modèles de troubles de l'alvéolisation comme l'injection post-natale de dexaméthasone ou d'hyperoxie (Hadchouel, Decobert et al. 2008).

**SPOCK2** (SPARC/osteonectin, CWCV, et Kazal-like domains proteoglycan 2) aussi connu sous le nom de Testican 2 est un membre du groupe des testicans, protéoglycane héparane sulfate et chondroïtine extra-cellulaire. SPOCK2 est exprimé dans le poumon de rat en développement et les niveaux d'ARNm changent avec les stades de développement, faiblement exprimé durant le stade canaliculaire et sacculaire puis augmenté entre P7 et P10, début de l'alvéolisation. Le taux maximum est trouvé à P18, fin de l'alvéolisation et reste élevé jusqu'à P28 (Hadchouel, Durrmeyer et al. 2011). Cette molécule intervient donc probablement dans la phase de septation alvéolaire ou dans sa finalisation. SPOCK2 est connue pour interagir avec la MMP-14 et MMP-16. Le rôle exact de SPOCK2 est en cours d'évaluation.

#### *4) Prolifération et différenciation épithéliale*

L'alvéologénèse est caractérisée par une prolifération intense des pneumocytes de type II, principale source de production du surfactant pulmonaire. Ils sont également les précurseurs des pneumocytes de type I qui tapissent la plus grande partie de la surface alvéolaire. Différents travaux ont montré que l'intégrité des mécanismes de différenciation et prolifération épithéliale était nécessaire à l'alvéolisation. Certains facteurs de transcription ou gènes sont également essentiels à l'alvéolisation. Ainsi, l'invalidation du gène codant le facteur de transcription Foxa2, nécessaire à la différenciation des pneumocytes de type II (Wan, Kaestner et al. 2004), le maintien d'un taux élevé du facteur de transcription GATA-6 également nécessaire à la différenciation épithéliale (Liu, Ikegami et al. 2003) entraînent des altérations du développement alvéolaire.

#### *5) Angiogenèse*

L'angiogenèse est également indispensable à l'alvéolisation. Le retrait de facteurs angiogéniques comme le VEGF ou le NO perturbe la croissance des vaisseaux et diminue l'alvéolisation chez les rats (Thebaud 2007). A l'inverse, les anomalies de la croissance alvéolaire dans différents modèles animaux et dans des autopsies d'enfants morts des suites d'une DBP sont associées à une diminution du nombre des petites artères et une distribution



vasculaire anormale, ainsi qu'à une diminution de l'expression du VEGF (Thebaud, Ladha et al. 2005). L'administration de VEGF, de NO ou l'activation d'HIF-1 $\alpha$  (activateur de la voie du VEGF) restaure un développement alvéolaire normal dans des modèles de DBP induits par l'hyperoxie (Thebaud, Ladha et al. 2005, Balasubramaniam, Maxey et al. 2006).

Le rôle fondamental du **VEGF** a été démontré dans des études sur l'inactivation du VEGF lui-même (Carmeliet, Ferreira et al. 1996, Ferrara, Carver-Moore et al. 1996) ou de ses récepteurs (Fong, Rossant et al. 1995, Shalaby, Rossant et al. 1995). Au niveau pulmonaire, pendant le stade canaliculaire, le taux de plusieurs isoformes du VEGF exprimées dans les cellules alvéolaires de type II augmente chez la souris en développement, lors des phases de croissance vasculaire pulmonaire maximale (Ng, Rohan et al. 2001). L'administration de VEGF recombinant à des rats nouveau-nés durant ou après l'exposition à l'hyperoxie augmente la croissance vasculaire et améliore l'alvéolisation (Kunig, Balasubramaniam et al. 2005, Kunig, Balasubramaniam et al. 2006). De même, l'administration intra trachéale d'adénovirus recombinant porteur de VEGF améliore la survie, augmente la formation de capillaires pulmonaires, préserve le développement alvéolaire et permet la formation de nouvelles alvéoles dans ce même modèle d'hyperoxie (Thebaud, Ladha et al. 2005). Le blocage des récepteurs du VEGF (VEGFR-1 ou- 2) entraîne également des troubles de l'alvéolisation (Jakkula, Le Cras et al. 2000, Tang, Karumanchi et al. 2011).

Certaines études suggèrent que l'angiogenèse pulmonaire induite par le VEGF est en partie relayée par le **monoxyde d'azote (NO)** (Thebaud, Ladha et al. 2005). Le traitement par NO inhalé améliore la vascularisation et l'alvéolisation dans un modèle expérimental de DBP induit par l'hyperoxie (Balasubramaniam, Maxey et al. 2006, Vadivel, Aschner et al.).

Cependant, dans un modèle expérimental de RCIU utilisant le L $\omega$ -Nitro-L- Arginine Méthyl Ester (L-NAME; inhibiteur de la Nitric Oxide synthase) chez des rates gestantes, Diaz *et al.* avaient montré des anomalies de l'alvéolisation quantifiées par morphométrie (augmentation de la surface alvéolaire diminution de la densité de surface alvéolaire) à J0 et J7 de vie, caractéristiques des lésions observées dans la DBP (Diaz, Lebras-Isabet et al. 2005). Bahtiyar *et al* dans le même modèle expérimental, ont montré une augmentation significative des taux de VEGFR-1 circulant dans le sang maternel par rapport aux témoins (112,5 versus 89,4 pg/mL ; p=0,032) (Bahtiyar, Buhimschi et al. 2007).

**L'adrénomédulline** est un vasodilatateur puissant qui permet la régénération vasculaire *in vivo* et *in vitro*. Les souris KO pour l'adrénomédulline décèdent *in utero* d'hémorragie

pulmonaire, cutanée et hépatique massive concomitante d'un désassemblage des cellules endothéliales (Shindo, Kurihara et al. 2001). L'expression d'ARNm d'adrénomédulline mesurée augmente dans le poumon de la naissance à P14 et l'administration d'un antagoniste spécifique diminue le nombre de capillaires pulmonaires de 30% et inhibe l'alvéolisation. L'administration d'adrénomédulline à des rats placés en hyperoxie restaure partiellement l'alvéolisation (Vadivel, Abozaid et al. 2010).

**L'angiopoïétine** et ses récepteurs **Tie1** et **Tie2** sont également impliqués dans l'angiogenèse pulmonaire. Les souris KO pour Tie1 sont normales jusqu'à E14 puis développent un œdème et une hémorragie pulmonaire et décèdent à P1. L'expression de Tie1 est principalement pulmonaire avec une augmentation des taux à partir du dix-huitième jour de vie embryonnaire qui persiste à l'âge adulte (Taichman, Schachtner et al. 2003). De même, l'expression de Tie2 augmente pendant l'alvéolisation et est maintenue à un niveau élevé (Tsao, Li et al. 2004). La balance entre l'angiopoïétine, facteur pro-angiogénique et l'**endostatine** facteur anti-angiogénique est indispensable au développement pulmonaire normal. Cet équilibre est perturbé en cas de DBP (Thomas, Seidenspinner et al. 2009).

**L'endogline** est un récepteur de surface cellulaire (CD105) du TGF- $\beta$  et sa synthèse est augmentée en cas d'hypoxie (Sanchez-Elsner, Botella et al. 2002). Son rôle dans le développement pulmonaire est mal connu. Elle régule le tonus vasculaire à travers des interactions avec la NO synthase endothéliale (Toporsian, Gros et al. 2005). Sous forme soluble, l'endogline inhibe *in vitro* la formation de tubes capillaires et augmente la perméabilité vasculaire (Venkatesha, Toporsian et al. 2006). Il existe, parallèlement à l'augmentation des taux d'endogline, chez les nouveau-nés ventilés, une diminution des taux de VEGF, d'angiopoïétine 1 et de leurs récepteurs respectifs suggérant un rôle possible de l'endogline dans la « dysangiogenèse » observée au cours de la DBP (De Paepe, Greco et al.).

#### *6) La formation des alvéoles est sous la balance des acides rétinoïques et des glucocorticoïdes*

Avant la phase de septation, le poumon contient une grande quantité de vitamine A. Ces précurseurs sont stockés dans les lipofibroblastes qui les transforment en acide rétinoïque. Il s'agit de cellules situées dans l'interstitium et concentrées dans les sites de formation alvéolaires (Dirami, Massaro et al. 2004). Les enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide rétinoïque sont l'aldéhyde déshydrogénase 1 (Aldh-1) et la rétinaldéhyde déshydrogénase 2 (Raldh-2) dont l'expression est augmentée durant la période de prolifération maximale des

cellules de parois alvéolaires (Hind, Corcoran et al. 2002). L'acide rétinoïque augmente l'expression du gène de la tropo-élastine dans les fibroblastes en culture (Liu, Harvey et al. 1993). Le rôle de l'acide rétinoïque dans le contrôle de la septation a été confirmé à plusieurs reprises. Chez le rat nouveau-né, l'administration d'acide rétinoïque augmente la septation (Massaro and Massaro 1996) et le nombre d'alvéoles, alors qu'un régime pauvre en vitamine A provoque un retard d'alvéolisation (Frey, Egli et al. 2004). De plus, la délétion simultanée de deux récepteurs de l'acide rétinoïque, RAR  $\gamma$  et RXR $\alpha$  (McGowan, Jackson et al. 2000) diminue le nombre d'alvéoles. Outre l'élastine, l'acide rétinoïque stimule l'expression de PDGF-A/PDGF-R $\alpha$  (Liebeskind, Srinivasan et al. 2000) (Chen, Chang et al. 2004) et du FGF18 (Chailley-Heu, Boucherat et al. 2005). De plus, l'administration d'acide rétinoïque dans un modèle d'emphysème généré par l'élastase permet une réparation des lésions observées chez le rat (Massaro and Massaro 1997). Cependant, ces résultats ne semblent pas transposables entre les espèces. Ainsi, chez le babouin prématuré ventilé, l'administration de rétinoïdes augmente la synthèse de l'élastine mais ne permet pas de restaurer une morphologie alvéolaire et micro-vasculaire normale (Pierce, Joyce et al. 2007).

## Chapitre 2 : Dysplasie Broncho-Pulmonaire

### I- Définition

Depuis 2000, le diagnostic de DBP et l'évaluation de sa sévérité répondent à une définition consensuelle basée sur une double évaluation de l'oxygénéo-dépendance à 28 jours de vie et au terme corrigé de 36 semaines d'aménorrhée (SA) (Tableau 1) (Jobe and Bancalari 2001). C'est le degré d'oxygénéo-dépendance à 36 SA qui définit la sévérité de la DBP et qui est significativement corrélé au devenir respiratoire et neurologique à long terme (Shennan, Dunn et al. 1988, Walsh, Yao et al. 2004). Les enfants prématurés avec une DBP légère (oxygénéo-dépendance à J28, mais sevrés à 36 SA) n'ont pas de morbidité respiratoire significativement augmentée comparativement aux grands prématurés sans DBP (Ehrenkranz, Walsh et al. 2005).

**TABLEAU 1.** DEFINITION DE LA DBP D'APRES JOBE ET BANCALARI (JOBE AND BANCALARI 2001).

Age gestationnel	< 32 SA	≥ 32 SA
Période d'évaluation finale	Terme corrigé de 36 SA (ou retour au domicile, si < 36 SA)	56 jours de vie (ou retour au domicile, si < 56 j)
	Supplémentation en O <sub>2</sub> pendant 28 jours associés aux besoins suivants à l'évaluation finale :	
DBP légère	Air ambiant	
DBP modérée	Supplémentation en O <sub>2</sub> avec Fi O <sub>2</sub> < 30%	
DBP sévère	Supplémentation en O <sub>2</sub> avec Fi O <sub>2</sub> ≥ 30% et/ou ventilation en pression positive	

Bien que les progrès dans les soins de néonatalogie aient permis une amélioration de la survie des extrêmes prématurés, les stratégies effectives pour réduire le risque de DBP manquent et 40% des extrêmes prématurés sont toujours atteints par cette pathologie (Fanaroff, Stoll et al. 2007). Les enfants atteints de DBP sont plus susceptibles d'avoir besoin d'un traitement à visée pulmonaire, d'être hospitalisé dans la première année de vie ou d'avoir un retard de développement psychomoteur (Ehrenkranz, Walsh et al. 2005).

## II- Epidémiologie

D'après les données de l'enquête périnatale nationale de 2010 (dernière enquête disponible), 7,4% des naissances vivantes concernent des enfants nés avant 37SA. La grande prématurité (naissance avant 32 SA) représente environ 0,8% du total des naissances, et la très grande prématurité (naissance avant 28 SA) concerne 0,7% des naissances vivantes. Pour les taux de DBP, une variation est observée selon les centres et est en partie liée à une application hétérogène de la définition mais également à des protocoles de prise en charge différents. Avec les progrès considérables de la réanimation néonatale et un meilleur contrôle des différents facteurs de risque identifiés, l'incidence de la DBP a dans un premier temps diminué pour atteindre un plateau depuis quelques années (Fanaroff, Stoll et al. 2007).

En Europe, le taux moyen de DBP à 36 SA est de 15,8% chez les prématurés de moins de 32 SA avec des variations de 10,5 à 21,8% selon les pays. Le taux moyen de DBP en Île-de-France est de 13,8% (Zeitlin, Draper et al. 2008). En Amérique du Nord, le taux moyen de DBP à 36 SA est de 22% chez les prématurés de moins de 1500 g à la naissance, avec des

variations importantes en fonction du taux de prématurité et du poids de naissance, passant de 46% chez les nouveau-nés de moins de 750 g à 10% chez ceux entre 1000 et 1500g (Fanaroff, Stoll et al. 2007).

### III- Description lésionnelle et physiopathologie

La DBP a été initialement définie comme une pathologie liée à la ventilation mécanique chez les enfants atteints de maladie des membranes hyalines. La description initiale comprenait une métaplasie muqueuse des voies aériennes, de l'emphysème et une importante fibrose interstitielle (Northway, Rosan et al. 1967). Indépendamment des pathologies antérieures, les poumons des enfants mourant de DBP montrent des anomalies du mésenchyme associées à un arrêt de la septation alvéolaire normale et de la micro-vascularisation. Ces anomalies sont directement liées avec le stade de développement pulmonaire à la naissance, témoignant d'une inhibition de la maturation pulmonaire normale (Husain et al., 1998; Coalson et al., 1999; Jobe and Ikegami, 2000; Bhatt et al., 2001; Lassus et al., 2001; Coalson, 2006; Thibeault et al., 2003b; Albertine et al., 2010).

Au fil des ans, résultant de l'amélioration des stratégies thérapeutiques et de la survie chez une plus grande proportion d'enfants nés très prématurés, les symptômes de la DBP ont évolué vers une diminution des lésions des voies aériennes mais une augmentation des troubles de la croissance alvéolaire (Chambers and van Velzen 1989, Rojas, Gonzalez et al. 1995). Ceci a conduit à une nouvelle définition de la DBP dans laquelle les anomalies de la croissance alvéolaire sont prédominantes conduisant à une diminution globale du nombre d'alvéoles et de la surface d'échanges gazeux (Husain, Siddiqui et al. 1998, Jobe 1999). La DBP est donc une pathologie respiratoire chronique liée à la prématurité définie par un besoin en oxygène ou en ventilation mécanique jusqu'à 36SA (Jobe and Bancalari 2001). La DBP est actuellement considérée comme le résultat de plusieurs agressions dont l'oxygène, le volo- et barotraumatisme et les infections sur un poumon immature avec une susceptibilité génétique liée à certains polymorphismes qui ont comme conséquence un arrêt de la maturation normale (Jobe and Bancalari 2001). Les enfants susceptibles de développer une DBP sont dans la phase sacculaire précoce ou dans la phase canaliculaire pour les plus immatures d'entre eux.

Les mécanismes physiopathologiques responsables restent en revanche incomplètement identifiés. Divers processus d'agression peuvent interférer avec les mécanismes de régulation

du développement normal du poumon distal et aboutir à des anomalies de l'alvéolisation. Les supports thérapeutiques nécessaires à la survie de l'enfant prématuré, oxygénothérapie et ventilation mécanique, constituent – paradoxalement – les principaux facteurs d'agression. L'inflammation anté- et postnatale joue également un rôle important dans la survenue d'une DBP. De nombreux arguments, obtenus sur modèle animal ou en pathologie humaine, témoignent d'anomalies de l'expression de produits de gènes essentiels au contrôle de l'alvéolisation, induites par ces différents facteurs d'agression. Les gènes concernés contrôlent notamment les deux grands phénomènes observés au cours de la multiplication alvéolaire : le renouvellement harmonieux de la matrice extra-cellulaire et la maturation de la micro-vascularisation pulmonaire (Bourbon, Boucherat et al. 2005).

#### IV- Facteurs de risque identifiés par les études épidémiologiques

Le facteur de risque de DBP le plus important est la diminution de l'âge gestationnel à la naissance et les enfants au seuil limite de viabilité (22-23 SA) développent dans 86 à 100% des cas une DBP (Costeloe, Hennessy et al. 2011). Plus récemment, l'association avec le RCIU a été démontrée ainsi que celle avec la prééclampsie, nous reviendrons plus tard sur ce point. Le sexe masculin est également associé à un risque plus élevé de DBP (Ehrenkranz, Walsh et al. 2005).

Concernant les facteurs environnementaux, la durée et le degré d'exposition à l'oxygène, et la durée de ventilation mécanique sont les facteurs de risque les plus fréquemment rapportés (Laughon, Langer et al. 2011). L'inflammation anté- et postnatale contribue également au développement d'une DBP (Speer 2009). La présence de certains agents infectieux spécifiques dans les voies aériennes comme *Ureaplasma urealyticum* a été associée à un plus grand risque de DBP (Speer 2009). L'existence d'un stimulus inflammatoire anténatal comme la chorioamniotite serait aussi susceptible de moduler le risque de DBP avec cependant des résultats contradictoires d'une étude à l'autre (Kent and Dahlstrom 2004, Viscardi, Muhumuza et al. 2004). Initialement identifié comme un facteur de risque de DBP, son rôle pathogénique a récemment été remis en cause. L'étude de différents modèles animaux de chorioamniotite montre comment l'inflammation fœtale peut influencer le développement pulmonaire (Speer 2009). L'induction d'une inflammation anténatale modérée entraîne une accélération de la maturation pulmonaire alors qu'une inflammation fœtale massive et entretenue entraîne des

altérations de la maturation micro-vasculaire et de la septation alvéolaire superposables à celles observées dans la DBP. Ces effets différents, bénéfiques ou délétères, ainsi que leurs interactions possibles avec les agressions postnatales pourraient expliquer en partie les résultats discordants des études épidémiologiques. Enfin, des facteurs hémodynamiques contribuent également au risque de DBP comme la persistance du canal artériel (Laughon, Langer et al. 2011) et/ou des apports hydro-sodés excessifs au cours des premiers jours de vie (Oh, Poindexter et al. 2005).

## V-Susceptibilité génétique

La susceptibilité génétique a émergé comme un potentiel facteur de risque de développement de DBP. Après prise en compte des facteurs confondants, les facteurs génétiques comptent pour 53% de l'héritabilité pour la DBP (Bhandari and Gruen 2006). Plus récemment, Lavoie *et al* ont montré que l'héritabilité de la DBP dans une population de 318 jumeaux prématurés (70 paires monozygotes et 89 paires dizygotes) était de 82 %. Les différences de concordance entre jumeaux monozygotes et dizygotes pour la survenue d'une DBP sont observées lorsque la définition d'une persistance d'une oxygénothérapie à 36SA est utilisée pour la DBP, mais ne sont plus présentes lorsque les DBP légères sont incluses, c'est-à-dire les enfants avec sevrage des besoins supplémentaires en oxygène entre le 28<sup>ème</sup> jour et 36SA (Lavoie, Pham et al. 2008). Le phénotype clinique à J28 ne serait donc que le reflet des agressions environnementales, alors que la persistance de l'oxygène-dépendance à 36SA dépendrait d'interactions gènes-environnement. Il existe d'ailleurs une bien meilleure corrélation entre le devenir respiratoire à moyen et long terme et l'évaluation à 36SA qu'entre le devenir respiratoire à moyen et long terme et l'évaluation à 28 jours (Ehrenkranz, Walsh et al. 2005).

## VI- DBP : l'hypothèse vasculaire

De récentes observations ont remis en question des notions anciennes qui établissaient que le développement vasculaire pulmonaire suivait passivement celui des voies aériennes. Des preuves de plus en plus nombreuses s'accumulent, suggérant que les vaisseaux pulmonaires facilitent la croissance alvéolaire normale durant le développement et contribuent à maintenir les structures alvéolaires pendant toute la vie (Thebaud and Lacaze-Masmonteil 2010).

Deux études sur les facteurs anti-angiogéniques vont dans ce sens. Le dosage dans les sécrétions trachéales de 65 prématurés, dans la première semaine de vie avant surfactant ou initiation d'une ventilation mécanique, montre que les patients qui vont être atteints de DBP à 36SA ont des taux de VEGF plus faibles et des taux de sFlt-1 (=VEGFR-1) plus élevés que ceux ne développant pas de DBP. Ceci indépendamment de l'existence ou non d'un RCIU (Hasan, Beharry et al. 2009). D'autre part, chez 92 grands prématurés le risque de développer une DBP à 36SA est directement corrélé au taux d'endostatine au cordon ombilical (Mohamed, Niyazy et al. 2011).

Nous reviendrons sur ce point dans la partie « conséquences à moyen terme du RCIU : anomalies de l'alvéolisation et DBP ».

## VII-Modèles animaux de DBP

### 1) Hyperoxie

Ce modèle a été largement employé pour explorer les voies moléculaires qui sont perturbées durant une septation aberrante et pour évaluer les molécules candidates pour prévenir, traiter ou gérer les perturbations de la septation ou du développement vasculaire associées à la DBP. Ces modèles ont inclus les rongeurs, les lapins, les moutons ou les primates non-humains. Les grands animaux, comme les primates ont été souvent étudiés car leur développement pulmonaire post-natal est parallèle à celui de l'Homme.

Les lésions pulmonaires induites par l'exposition aux facteurs de risque de DBP décrits chez l'Homme reproduisent les anomalies de l'alvéolisation observées chez celui-ci. Ainsi, les babouins prématurés intubés et ventilés, correspondant à un développement pulmonaire de 30SA chez l'Homme, recevant de l'oxygène en quantité adaptée pour maintenir des concentrations artérielles d'oxygène normales avaient des lésions pulmonaires significativement moins importantes que ceux ventilés avec 100% d'oxygène (Delemos, Coalson et al. 1987). Dans une étude similaire, les babouins nés prématurément (75% de gestation) ont été exposés durant 7 jours à 100% d'oxygène versus de l'oxygène en quantités adaptées à la PaO<sub>2</sub> suivi de 14 jours de FiO<sub>2</sub> à 80% (Coalson, Winter et al. 1995). L'examen pulmonaire réalisé à 8 mois de vie retrouvait des lésions pulmonaires *a minima* chez les animaux avec une FiO<sub>2</sub> adaptée et des alvéoles élargies et dont le nombre était diminué dans le groupe « hyperoxie ». De façon notable, cet élargissement des alvéoles associé à une diminution de leur nombre est également retrouvé chez des babouins prématurés aux 2/3 de la gestation avec une



ventilation mécanique *a minima* et une oxygénothérapie, témoin de l'importance que joue l'immaturation pulmonaire dans la réponse pulmonaire à l'oxygène (Coalson, Winter et al. 1999).

Bien que l'étude des primates ait beaucoup apporté à la compréhension des troubles induits par l'oxygène, leur manipulation n'est pas toujours simple. L'étude des petits animaux a permis de compléter les connaissances. En 1967, Northway *et al.* ont montré que l'exposition de souris à 100% de FiO<sub>2</sub> induisait un phénotype pulmonaire comparable à celui observé en cas de DBP avec une simplification du schéma alvéolaire, une augmentation de la compliance pulmonaire, une augmentation de la sensibilité aux infections virales et une maladie vasculaire pulmonaire (Bonikos, Bensch et al. 1976). Depuis, de nombreuses équipes se sont intéressées aux effets de l'hyperoxie avec des schémas d'administration très variables que ce soit en terme de timing d'administration et de durée ou de dose d'oxygène (60 à 100%) (Buczynski, Maduekwe et al. 2013). Cependant certaines conclusions doivent rester prudentes car alors que le poumon de raton est adapté à la vie extra-utérine le poumon de prématuré humain, même s'il est au même stade de développement global, n'est pas physiologiquement prêt.

## 2) *Inflammation anténatale*

Etant donné la complexité des expositions cliniques à l'inflammation, les modèles animaux avec un contrôle strict de certains paramètres ont été étudiés. L'injection intra-amniotique d'endotoxine cause des lésions anatomiques semblables à celles observées en cas de DBP (diminution de la septation alvéolaire et diminution du développement microvasculaire) (Willet, Jobe et al. 2000). Dans les 2 jours suivant l'injection d'endotoxine, les cytokines inhibant le développement vasculaire comme l'IP-10 (Interferon- $\gamma$ -inducible protein) et le TGF- $\beta$  augmentent alors que la synthèse de la NO synthase endothéliale diminue dans les petits vaisseaux pulmonaires (Kallapur, Jobe et al. 2003, Kunzmann, Speer et al. 2007). D'autres marqueurs vasculaires comme le VEGF (mRNA et protéine) et son récepteur, le VEGFR-2 et PECAM diminuent et il y a une hypertrophie des muscles lisses des artérioles distales observées au 7ème jour.

Cependant, cette réponse aux endotoxines pourrait être réversible en ce qui concerne leurs conséquences pulmonaires. Ainsi, l'injection intra-amniotique pendant 28 jours chez l'agneau entre le 80ème et le 108ème jour de gestation diminue le nombre d'alvéoles au 125ème jour

de gestation mais leur nombre est quasiment normal à terme, malgré une inflammation de bas grade persistante (Kallapur, Nitsos et al. 2005).

### 3) *Inflammation post-natale*

L'instillation dans les premiers jours de vie de lipopolysaccharide (LPS) par voie intra trachéale chez des rats reproduit les anomalies de l'alvéolisation observées en cas de DBP avec un afflux de polynucléaires neutrophiles dans la trachée et une perturbation de l'activité des métalloprotéases de la matrice extra-cellulaire (Franco, Waszak et al. 2002).

## Chapitre 3 : Croissance et retard de croissance

La croissance intra-utérine s'effectue par multiplication cellulaire jusqu'à la seizième semaine puis par augmentation de la taille des cellules à partir de la trente-deuxième semaine. Entre ces deux périodes, les deux mécanismes surviennent de façon conjointe. Jusqu'à vingt semaines, les deux mécanismes se chevauchent. Jusqu'à 20 semaines, la croissance intra-utérine est principalement sous la dépendance de l'insulin growth factor 2 (IGF-2), remplacée ensuite par l'IGF-I qui devient le facteur prépondérant (Gicquel and Le Bouc 2006). La sécrétion fœtale d'IGF-I dépend directement du statut nutritionnel du fœtus (Gicquel and Le Bouc 2006). La nutrition du fœtus est liée à la capacité de la part de la mère de fournir du sang oxygéné à la circulation utérine, à la qualité de la placentation et aux fonctions de transfert du placenta, et aux capacités du fœtus à extraire des nutriments du placenta. Le placenta assure à partir du quatrième mois la croissance fœtale. Le flux du placenta vers le fœtus sert à trois éléments de cette croissance : le métabolisme placentaire lui-même, la production d'énergie et de chaleur chez le fœtus grâce au métabolisme oxydatif et le stockage qui permet la formation de nouveaux tissus et la croissance fœtale. En cas de privation énergétique, le fœtus préserve son métabolisme oxydatif aux dépens de sa croissance.

La croissance fœtale est donc la résultante de facteurs environnementaux propres au fœtus et de facteurs génétiques, l'ensemble étant étroitement lié. Sa régulation est un processus complexe et multifactoriel encore mal connu dans lequel interviennent notamment :

- des facteurs génétiques : le sexe, l'ethnie, le poids et la taille des parents, principalement de la mère ;
- des facteurs nutritionnels maternels à la fois pré gravidique et *per* gestationnel ;
- de facteurs circulatoires conditionnant la croissance et la fonction du placenta ;

- de facteurs hormonaux fœtaux comme l'IGF-I et l'insuline ou maternels comme l'insuline elle-même.

Le RCIU (RCIU) est une des principales pathologies faisant poser l'indication d'un accouchement prématuré pour un « sauvetage » maternel ou fœtal.

## I-Définitions

Il existe deux manières d'apprécier la croissance intra-utérine et il en résulte des définitions différentes de l'insuffisance de cette croissance.

Une approche « collective » qui compare les mensurations du fœtus ou du nouveau-né principalement le poids avec des valeurs de référence établies par des études épidémiologiques en population. Cette méthode individualise des sujets de trop faible poids pour leur âge gestationnel et donc atteints d'hypotrophie fœtale ou de RCIU. Cette méthode a l'avantage d'être simple dès lors qu'on dispose de valeurs de référence pertinentes mais cela nécessite de choisir un seuil en-deçà duquel on considère que la croissance intra-utérine est considérée comme insuffisante pour l'âge gestationnel (3<sup>ème</sup>, 5<sup>ème</sup> ou 10<sup>ème</sup> percentile, -2DS) et d'autre part de mélanger deux sous-populations : celle des sujets petits de façon constitutionnelle et qui ne sont donc pas à risque de développer des pathologies à proprement parler et celle des fœtus atteints ou affectés en cours de grossesse par une pathologie qui a réduit leur croissance génétiquement programmée. Depuis un demi-siècle de nombreuses courbes de croissance ont été mises au point, basées sur ce principe, pour des nouveau-nés d'âges gestationnels différents (Alexander, Himes et al. 1996). La première a été réalisée par Mme Lubchenco à Denver à partir de constations faites sur 5635 nouveau-nés issus de familles défavorisées. La particularité de cette population vient de l'altitude particulièrement élevée de Denver, 1609m pouvant induire des situations d'hypoxie relative (Lubchenco, Hansman et al. 1966). En France, les plus récentes, sont celles réalisées par le groupe de travail Audipog basées sur les données issues de 97 222 naissances dans des grossesses uniques survenues entre 1984 et 1988 dans 22 maternités françaises réparties sur l'ensemble du territoire (Mamelle, Munoz et al. 1996). Toutes ces courbes ont des caractéristiques communes avec une forme générale sigmoïde. Elles comportent une zone de croissance linéaire entre 26 et 37-39SA et montrent un infléchissement de la croissance intra-utérine après ce terme.

Une approche « individualisée » est utilisée en recherche épidémiologique moderne, dans laquelle le poids de naissance standard a été réévalué pour classer le poids de naissance

de l'enfant en fonction de son potentiel de croissance personnel et non en fonction de la moyenne de la population. Ceci est basé sur trois principes (Gardosi, Chang et al. 1992, Gardosi 2009). En premier lieu, le standard doit être ajusté sur les caractéristiques maternelles telles que le poids, la taille, la parité et l'origine ethnique. En second lieu, les enfants de femmes ayant des pathologies susceptibles d'induire un RCIU telles que l'hypertension ou le diabète ou consommant des substances comme le tabac ou l'alcool ou ayant des antécédents d'accouchement prématuré doivent être exclus des modèles de prédiction. Enfin, le terme « poids optimal » doit être basé sur des courbes prenant en compte exclusivement les estimations de poids fœtal (excluant donc les poids de naissance des enfants nés prématurément ne reflétant pas les conditions physiologiques). Ainsi, Gardosi *et al* ont proposé une approche individualisée, pour certains groupes ethniques (incluant des minorités issues de l'immigration) résidant dans les pays développés, qui prend en compte l'origine ethnique maternelle, la taille et le poids (avant la grossesse), la parité et le sexe de l'enfant (Gardosi, Chang et al. 1992, Gardosi, Mongelli et al. 1995). La validation de ces nouvelles courbes, dites individualisées, a été démontrée par des données fœtales (augmentation de la fréquence de Doppler anténataux pathologiques, de signes de stress fœtal, du taux de césarienne) et néonatales (taux d'admission et d'hospitalisation prolongée mais aussi nombre de mort-nés ou mortalité néonatale) chez les nouveau-nés identifiés comme porteur d'un RCIU sur ces courbes individualisées et sur des courbes standard. L'intérêt de ces courbes individualisées est donc d'améliorer la corrélation avec la morbi-mortalité fœtale et néonatale tout en réduisant le nombre de faux-positifs (petit poids constitutionnel) afin de réduire le nombre d'interventions inutiles.

## II- Diagnostic étiologique

Les étiologies du RCIU sont diverses et variées et trouvent leurs origines en début ou en fin de grossesse (Tableau 2). La diminution de la croissance fœtale en cas de RCIU est une adaptation à un environnement intra-utérin défavorable et a comme conséquences des altérations permanentes du métabolisme, de la croissance et du développement (Barker, Eriksson et al. 2002).

**TABLEAU 2 : PRINCIPALES ETIOLOGIES DU RCIU (GOLD 2010)**

<p><b><i>Causes maternelles</i></b></p> <p><u>Terrain</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Age &lt;20 ou &gt;35 ans, primiparité</li> <li>- Faible niveau socio-économique, altitude élevée</li> </ul> <p><u>Pathologies maternelles</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Malnutrition maternelle chronique</li> <li>- Hypertension artérielle chronique, pré- éclampsie (40%)</li> <li>- Hypoxie chronique : anémie, cardiopathie</li> <li>- Pathologie maternelle chronique : insuffisance rénale, lupus</li> <li>- Malformation utérine, fibrome</li> <li>- Intoxications : tabac, alcool, drogue</li> </ul>
<p><b><i>Causes placentaires</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ischémie, hypovascularisation involution précoce</li> <li>- Chorangiome, hémangiome</li> <li>- Anomalies d'implantation, placenta praevia</li> <li>- Anomalies du cordon (artère ombilicale unique)</li> </ul>
<p><b><i>Causes fœtales</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aberrations chromosomiques fœtales (10 à 15%)</li> <li>- Syndromes malformatifs</li> <li>- Infections congénitales rubéole, toxoplasmose, cytomégalovirus</li> <li>- Grossesses multiples</li> </ul>
<p><b><i>RCIU idiopathiques (20 à 30%)</i></b></p>

Si le RCIU est précoce pendant la grossesse, la restriction de croissance aboutit à une hypotrophie « symétrique » avec un poids, taille et périmètre crânien affectés de façon équivalente. Les causes de retard de croissance symétrique sont principalement des anomalies génétiques (trisomies, autres anomalies chromosomiques ou constitutionnelles, nanisme), des infections virales congénitales, des erreurs innées du métabolisme et l'exposition aux drogues *in utero* (Rosenberg 2008).

Le RCIU à début plus tardif, qui est le plus fréquent, est généralement dû à un défaut de fonctionnement utéro-placentaire (prééclampsie, diabète, hypertension chronique) ou à une malnutrition maternelle, provoquant une diminution des apports en nutriments et en oxygène provenant du placenta. Les fœtus ne parviennent pas à se développer, leur gain pondéral est modeste et est associé à une épargne relative de la croissance osseuse et cérébrale. Même une petite diminution des substrats énergétiques limite la formation de tissu adipeux et de glycogène comme de muscle squelettique (Lapillonne, Braillon et al. 1997). La croissance osseuse et donc la taille sont affectées, mais la croissance du périmètre crânien est préservée grâce au phénomène de redistribution cérébrale préférentielle du débit cardiaque.

1) *La prééclampsie : étiologie la plus fréquente de RCIU*

Il s'agit d'une pathologie exclusivement humaine et multifactorielle caractérisée sur le plan clinique par une hypertension et une protéinurie débutant après 22 semaines d'aménorrhée (SA). C'est la principale cause de morbidité fœtale et maternelle dans le monde (5 à 7% des grossesses) (Zhang, Meikle et al. 2003). En l'absence de traitement spécifique et d'identification précoce des femmes à risque, le seul traitement de cette pathologie est l'accouchement. Les modifications pathologiques les plus précoces (entre 8 et 16 SA) surviendraient dans la circulation utéro-placentaire. Dans un deuxième temps, entre 22 et 40 SA, le placenta ischémique sécrèterait des facteurs circulants qui provoqueraient une atteinte des cellules endothéliales.

Normalement, chez l'Homme, au cours de la grossesse, le cytotrophoblaste, en envahissant l'utérus, voit son profil d'expression des molécules d'adhésion modifié passant d'un phénotype épithélial à un phénotype endothélial (intégrines, cadhérines et membres de la famille des immunoglobulines) (Zhou, Damsky et al. 1997). En cas de prééclampsie, le cytotrophoblaste n'exprime pas les marqueurs de cellules endothéliales. Le résultat est, entre autres, une invasion inadéquate des artères spiralées maternelles au début de la grossesse (Roberts 2000). Les résultats de plusieurs études appuient la théorie d'une dysfonction endothéliale à l'origine des lésions maternelles dans la prééclampsie (Taylor, Crombleholme et al. 1991, Hsu, Iriye et al. 1993, Friedman, Schiff et al. 1995). Une augmentation des taux circulants de fibronectine, de facteur VIII, et de thrombomoduline, tous marqueurs de souffrance endothéliale a été rapportée. Cette dysfonction endothéliale généralisée pourrait expliquer une grande partie des symptômes de la prééclampsie (Roberts 1998) : hypertension artérielle par anomalie du contrôle endothélial du tonus vasculaire, protéinurie par augmentation de la perméabilité glomérulaire (endothéliose glomérulaire observée sur les biopsies rénales (Fisher, Luger et al. 1981) et coagulopathie comme résultante de l'expression anormale de facteurs pro-coagulants. La dysfonction du trophoblaste villositaire provoque des phénomènes hypoxiques associés au stress oxydatif qui ont pour conséquence sur le fœtus un RCIU (RCIU), une hypoxie chronique (souffrance fœtale) voire une mort fœtale *in utero* et sur le placenta une hypotrophie et/ou des infarctus.

## *2) Prééclampsie : rôle des facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques*

De nombreuses équipes travaillant sur l'hypothèse d'une « théorie vasculaire » de la prééclampsie ont essayé d'identifier les facteurs circulants qui en seraient à l'origine. Au dé-

but des années 2000, des cancérologues et des néphrologues ont mis en évidence, chez des patients traités pour un cancer colo-rectal par un anticorps anti-VEGF une protéinurie associée à une hypertension artérielle semblable à celle observée dans la prééclampsie (Kabbinar, Hurwitz et al. 2003).

Le VEGF est un facteur de croissance produit par de nombreux types cellulaires et organes, y compris le placenta. Plusieurs isoformes existent en raison d'un épissage alternatif. Le VEGF 165 et le VEGF 121 ont une grande activité mitogène et sont impliqués dans différents processus physiologiques incluant la formation de nouveaux vaisseaux notamment dans le développement placentaire (Torry and Torry 1997). Ces isoformes sont solubles dans la circulation. Le VEGF induit également la synthèse de monoxyde d'azote et de prostacyclines vasodilatatrices dans les cellules endothéliales suggérant un rôle dans la diminution du tonus vasculaire et de la pression artérielle (Morbide, Chang et al. 1996, He, Venema et al. 1999). La synthèse de VEGF est induite par l'hypoxie.

Le VEGF transmet un signal par l'intermédiaire de deux récepteurs tyrosine kinase : le VEGFR-1 (VEGFR-1/Flt1) et le VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Le VEGFR-1 est aussi exprimé sous forme de protéine soluble qui est générée par un épissage alternatif du gène de la fms-like tyrosine kinase (Flt1) (Kendall and Thomas 1993). La forme soluble (sFlt-1) contient la portion de liaison au ligand mais les portions transmembranaires et cytoplasmiques activateuses de VEGFR-1 manquent (He, Smith et al. 1999). Le sFlt-1 est exprimé à haut niveau par le trophoblaste villositaire et extra-villositaire. Il a une forte activité antagoniste et se lie à toutes les isoformes du VEGF et au PlGF (Placenta Growth Factor). Sous forme libre dans le sérum il peut diminuer la fraction circulante de ces deux facteurs (Clark, Smith et al. 1998). En revanche, la surexpression de VEGFR-2, qui est un antagoniste du VEGF (mais pas du PlGF), chez des rates gestantes n'entraîne pas de signe de prééclampsie (Maynard, Min et al. 2003).

Chez l'Homme, l'étude de l'expression des gènes placentaires issus de grossesses compliquées de prééclampsie a été réalisée par Maynard *et al* par la technique des puces d'expression d'ARN. Une quantité augmentée d'ARNm pour sFlt-1 a été mise en évidence. Un dosage sanguin réalisé parallèlement a montré une augmentation du taux circulant de sFlt-1 d'un facteur 5 en moyenne par rapport aux grossesses normales (Maynard, Min et al. 2003). Hertig *et al* ont montré que l'augmentation de sFlt-1 est significative entre 27 et 30 SA chez les femmes présentant une prééclampsie par rapport aux femmes ayant une grossesse normale ou présentant une hypertension artérielle isolée. Cette augmentation apparaît en moyenne 11,2 semaines avant l'apparition des signes cliniques et persiste jusqu'à l'accouchement (Hertig, Berkane et al. 2004). Chez la femme, des explants villositaires prélevés lors de grossesses nor-

males ou compliquées de prééclampsie ont été mis en culture. Les taux élevés de sFlt-1 présents avaient un effet anti-angiogénique, et diminuaient la migration des cellules endothéliales issues de sang de cordon ainsi que la formation de tubes vasculaires *in vitro* (Ahmad and Ahmed 2004).

En ce qui concerne les modèles expérimentaux, l'injection à des rates gestantes d'adénovirus recombinant exprimant sFlt-1 a comme conséquence une hypertension artérielle significative associée à une protéinurie reproduisant un modèle expérimental de prééclampsie (Maynard, Min et al. 2003).

### III- Prise en charge d'un enfant avec un RCIU

L'examen clinique initial doit s'attacher à identifier la cause du RCIU. L'examen clinique et l'évaluation de l'âge gestationnel de ces enfants est rendu difficile en raison d'une diminution du *vernix caseosa*, de la peau sèche et craquante, du cartilage des oreilles moins bien formé, d'une diminution du tissu mammaire et d'une apparence moins mature des organes génitaux externes féminins. L'examen neurologique est moins affecté par le RCIU et peut servir de base à une évaluation plus précise de l'âge gestationnel même si l'état de veille/sommeil peut être difficile à prendre en compte (Rosenberg 2008).

Indépendamment de la cause du RCIU, l'incidence des malformations des organes génitaux externes à type d'hypospadias et de cryptorchidie est plus élevée chez les garçons porteurs d'un RCIU. L'étude de Jensen rapporte que, si le poids de naissance d'un singleton est bas comparé au poids moyen de naissance de ses autres frères ou que le poids de naissance d'un jumeau est plus bas que l'autre, il existe une augmentation du risque d'anomalies urogénitales (Jensen, Wilcox et al. 2012).

#### 1) Taux de mortalité

Les nouveau-nés atteints de RCIU ont un risque de mortalité plus élevé que les nouveau-né eutrophes de même âge gestationnel. La prématurité fréquemment associée est un facteur de risque supplémentaire. En Europe, l'étude MOSAIC, portant sur 4525 enfants nés avant 31SA montre que le taux de mortalité est de 25,8% pour les enfants dont le poids de naissance est inférieur au 10<sup>ème</sup> percentile de 19,6% pour les enfants dont le poids de naissance est compris entre le 10<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> percentile alors qu'il n'est que de 12 à 13% pour



les enfants dont le poids est compris entre le 50<sup>ème</sup> et le 89<sup>ème</sup> percentile (groupe de référence). Après ajustement pour les facteurs confondants, l'*odds ratio* concernant le risque de mortalité pour les deux groupes de poids les plus bas est de 3.98 (2.79-5.67) et de 2.15 (1.54-3.00) respectivement (Zeitlin, El Ayoubi et al. 2010). La méta-analyse réalisée par Damodaram montre, après regroupement de 11 études, que le risque de mortalité néonatale augmente d'un facteur 3,5 entre 24 et 28SA, d'un facteur 5,5 entre 28 et 32SA et d'un facteur 16 entre 32 et 37SA chez les fœtus porteurs d'un RCIU (Damodaram, Story et al. 2011).

## 2) Conséquences néonatales immédiates du RCIU

Les conséquences néonatales immédiates du RCIU sont l'asphyxie périnatale et les problèmes d'adaptation néonatale. Le risque de ces complications est augmenté quel que soit l'âge gestationnel. McIntire et al ont réalisé une étude monocentrique, portant sur 123 000 naissances, qui compare le devenir des nouveau-nés prématurés ou à terme en fonction de leur poids de naissance rapporté à leur âge gestationnel. La classe de référence est la classe de poids 26<sup>ème</sup>-75<sup>ème</sup> percentile. Chez les nouveau-nés à terme, présenter un retard de croissance augmente le risque d'asphyxie périnatale avec une incidence de pH inférieur à 7 au cordon et de score d'Apgar inférieur à 3 à 5 minutes multipliées par 2 quand le poids de naissance est inférieur au 3<sup>ème</sup> percentile. Le RCIU augmente également de façon significative le risque d'avoir besoin d'une intubation à la naissance, de convulsions durant les premiers jours de vie et de sepsis de façon significative (McIntire, Bloom et al. 1999).

### a) Complications respiratoires

Elles seront présentées dans un chapitre dédié.

### b) Conséquences neurologiques

Mc Intire et al ont montré une augmentation du risque d'hémorragie intra-ventriculaire (HIV) de grade III-IV chez les prématurés dont le poids de naissance est inférieur au 3<sup>ème</sup> percentile et une augmentation du risque de décès en période néonatale (28 premiers jours de vie) (McIntire, Bloom et al. 1999). Le risque d'HIV, tout grade confondu, est 1,6 fois plus élevé entre 24 et 28SA, 2,3 fois plus élevé chez les 28-31+6 et 2 fois plus élevé chez les 32-36+6 dans le groupe RCIU dans une méta-analyse (Damodaram, Story et al. 2011).

### c) Conséquences digestives

Les anomalies de la circulation mésentérique fœtale associées à la redistribution circulatoire liée à l'hypoxie fœtale peuvent aboutir à des lésions ischémiques intestinales contribuant au développement d'une entéocolite ulcéro-nécrosante. Les autres mécanismes possibles sont une diminution de la longueur du tractus intestinal, une altération des villosités et de la taille du foie (Longo, Bollani et al. 2012).

#### d) Conséquences métaboliques

Les principaux problèmes métaboliques observés en période néonatale sont l'hypoglycémie et l'hypocalcémie. Le risque d'hypoglycémie est majeur dans les premiers jours de vie quand le nouveau-né doit s'adapter à la vie extra-utérine sans la source de nutriments qu'est le placenta. Etre capable d'augmenter sa glycémie requiert en effet, des réserves en glycogène (source prédominante de glucose dans les premières heures de vie) qui sont diminuées chez l'enfant RCIU. De plus, les enfants avec RCIU ont des stocks de graisse limités au niveau du tissu adipeux et l'oxydation des acides gras est dysfonctionnelle (Longo, Bollani et al. 2012). Le déficit en corps cétoniques expose particulièrement les enfants aux séquelles neurologiques de l'hypoglycémie (Ward Platt and Deshpande 2005). Il existe en outre, un hyperinsulinisme ou une sensibilité accrue à l'insuline pouvant exacerber l'hypoglycémie (Longo, Bollani et al. 2012).

#### e) Conséquences hématologiques

L'hypoxie intra-utérine liée à un dysfonctionnement placentaire peut être responsable d'une polycythémie et d'une thrombopénie. L'hypoxie intra-utérine chronique induit la synthèse d'érythropoïétine, responsable d'une augmentation de la masse globale de la lignée rouge.

La plupart des cas de thrombopénie sont modérés et le recours à une transfusion de culot plaquettaire reste rare (Wasiluk, Mantur et al. 2009). Une des hypothèses pour expliquer cette thrombopénie est celle du rôle des facteurs anti-angiogéniques comme le sFlt-1, impliqués dans la prééclampsie, sur la lignée médullaire. Les taux de sFlt-1, de PlGF et de VEGF ont été dosés dans le sang de cordon ombilical de 69 enfants nés entre 26 et 37 SA. Chez les nouveau-nés de mère atteintes de prééclampsie, le taux de sFlt-1 est plus élevé (148,2 *versus* 98,8 pg/mL ;  $p=0,03$ ) et le taux de VEGF circulant est plus bas (18,8 *versus* 98,8 pg/mL ;  $p=0,046$ ). Une corrélation négative a été mise en évidence entre le taux de sFlt-1 et la numération plaquettaire à la naissance (Tsao, Wei et al. 2005).

#### f) Conséquences infectieuses

Le risque de sepsis néonatal est augmenté chez les prématurés hypotrophes comparés aux prématurés eutrophes. Cette susceptibilité aux infections s'explique par un déficit de l'immunité humorale et cellulaire (diminution de la concentration en IgG et de l'index phagocytaire) et par une fréquente neutropénie. Cependant, le facteur de croissance granulocytaire GM-CSF n'a pas montré son efficacité dans la prévention des sepsis secondaires chez le prématuré hypotrophe (Carr, Brocklehurst et al. 2009).

### *3) Conséquences à long terme*

#### *a) Conséquences neurologiques*

Les nouvelles techniques avancées de neuro-imagerie par IRM (diffusion, tractographie et spectroscopie) ont permis de caractériser les modifications du développement cérébral résultant d'une altération de la croissance fœtale. Chez les prématurés avec RCIU il existe :

- une diminution du volume de la substance grise et du volume intracrânien total par rapport aux prématurés eutrophes sur des IRM précoces ou au terme corrigé (Tolsa, Zimine et al. 2004). Cette différence persiste jusqu'à l'âge de 15 ans avec une diminution de la surface corticale par rapport aux nouveau-nés à terme mais pas par rapport aux prématurés eutrophes (Martinussen, Flanders et al. 2009) ;
- une diminution plus spécifique du volume de l'hippocampe, inversement proportionnelle au poids de naissance (Lodygensky, Seghier et al. 2008) ;
- des modifications de la créatinine et des lactates impliqués dans les mécanismes énergétiques cérébraux (Sizonenko, Borradori-Tolsa et al. 2008).

De façon intéressante, le soutien du développement des prématurés RCIU dans le cadre du programme NIDCAP (Neonatal Individualized Developmental Assessment Program) améliore la maturation cérébrale

Chez les enfants nés à terme ou avec une prématurité modérée, le RCIU multiplie par 3 à 5 le risque de paralysie cérébrale (Jarvis, Glinianaia et al. 2005). Cette relation est inconstamment retrouvée chez le grand prématuré (Livinec, Ancel et al. 2005).

A l'âge de deux ans, les données concernant le développement cognitif sont discordantes. Selon les résultats de l'étude Epipage menée en France chez des prématurés de moins de 33SA, le quotient de développement évalué grâce au test de Brunet Lézine n'est pas significativement différent entre le groupe d'enfant atteint d'un RCIU et le groupe d'enfant « eutrophe » (Fily, Pierrat et al. 2006). D'autres études montrent que le fait d'avoir un RCIU diagnostiqué sur des courbes néonatales est un facteur de risque de développement psychomoteur pathologique ( $PDI < 70$ ) chez les filles uniquement, alors que le RCIU diagnostiqué sur des courbes fœtales n'augmenterait pas ce risque (Streimish, Ehrenkranz et al. 2012). A noter que le doppler de l'artère ombilical n'est pas corrélé non plus au quotient de développement à 2 ans (Eger, Sommerfelt et al. 2013).

A l'âge de 5 à 6 ans, le RCIU est un facteur de risque indépendant de troubles de l'attention et d'hyperactivité (Heinonen, Raikkonen et al. 2010). En ce qui concerne les enfants de la cohorte Epipage, alors que le RCIU n'était pas un facteur de risque de troubles du développement neurologique à 2 ans, on note qu'à l'entrée à l'école, le RCIU est responsable, chez les enfants nés entre 29 et 32SA, d'une augmentation de la fréquence de survenue de difficultés cognitives mineures, de l'existence de symptômes d'inattention-hyperactivité et de difficultés scolaires (Guellec, Lapillonne et al. 2011). Ces troubles sont plus marqués notamment au niveau du langage avec plus de difficultés de compréhension, de langage lui-même ou de répétitions non-verbales (Simic Klaric, Kolundzic et al. 2012). Le rattrapage de croissance post-natale et notamment sur le périmètre crânien dans les deux premières années est associé à un meilleur développement neurologique chez les hypotrophes (Leppanen, Lapinleimu et al. 2014) (Pylypow, Spector et al. 2009).

A l'adolescence, les résultats sont là encore discordants. La cohorte de Haguenau a permis l'étude des résultats scolaires évalués au début du secondaire et d'obtention du baccalauréat, chez des enfants nés entre 1971 et 1985 en Alsace. Les jeunes adultes nés RCIU ont de moins bons résultats scolaires pendant l'enfance et l'adolescence que ceux de poids initial normal, après ajustement sur les caractéristiques familiales (Larroque, Bertrais, Pediatrics 2001). Une étude israélienne ne retrouve pas de différence à l'âge de 17 ans chez les RCIU nés à terme et des témoins eutrophes nés entre 1974 et 1976 (Paz, Laor et al. 2001).

A l'âge adulte, on ne note pas de différence de nombre d'années d'études, d'heures de travail hebdomadaire ou de satisfaction pour la qualité de vie (Strauss 2000). Cependant, les adultes nés RCIU ont moins souvent des professions managériales et ont un salaire annuel plus bas que les enfants eutrophes (Strauss 2000).

Toute la difficulté dans ces études vient du regroupement d'enfants dont l'étiologie du RCIU est probablement différente et de l'effet de la prématurité plus ou moins induite dans ces circonstances. A ces données s'ajoutent le poids de l'environnement post-natal dans le développement, qui n'a pas toujours été bien évalué.

A ce jour, seul un essai randomisé, l'étude GRIT (Growth Restriction Intervention Trial) a été réalisée pour étudier précisément l'impact de la prématurité induite sur le devenir neurocognitif à 2 ans. Aucune différence n'a été notée entre prise en charge active immédiate (extraction médicalement décidée) ou retardée (expectative) (Thornton, Hornbuckle et al. 2004).

#### b) Conséquences métaboliques

Le RCIU a été associé au développement de maladies à l'âge adulte. Ce phénomène est appelé « programmation fœtale » et cette hypothèse a été formulée par Barker d'où sa dénomination fréquente « d'hypothèse de Barker » (Hales and Barker 1992). Le fœtus avec un RCIU serait programmé pour développer un phénotype « économe » avec une augmentation de la prise alimentaire et du stockage des graisses et probablement une diminution de la consommation d'énergie. Il est maintenant établi qu'un lien existe entre faible poids de naissance et développement à l'âge adulte de maladies coronariennes, d'hypertension artérielle et de diabète de type 2. Plusieurs preuves viennent également appuyer le lien entre RCIU et obésité chez l'adulte. Les études épidémiologiques réalisées chez des individus nés pendant l'hiver 1944-1945 aux Pays-Bas, période de la grande famine, montrent que la privation alimentaire maternelle est associée à une diminution du poids de naissance, à une augmentation de l'incidence de l'obésité, à une résistance à l'insuline et une hypertension artérielle (de Rooij, Painter et al. 2006, Stein, Zybert et al. 2006). L'étude d'une autre cohorte anglaise cette fois par Barker *et al.* montre une augmentation du risque de décès par pathologies coronariennes ou accident vasculaire cérébral à l'âge adulte (Barker, Osmond et al. 1989). Cette programmation pourrait passer par des modifications épigénétiques irréversibles (méthylations, acétylations de l'ADN, modification des histones) de la chromatine modulant l'expression des gènes.

## IV- RCIU : modèles animaux

### 1) *Espèces animales couramment utilisées pour le RCIU*

Parmi les premiers modèles animaux utilisé pour le RCIU, on trouve celui décrit chez le rat par Wigglesworth en 1964 qui a réalisé une ligature unilatérale de l'artère utérine (Wigglesworth 1964) ; en 1969, l'équipe de Younoszai a proposé l'inhalation de fumée de cigarette toujours chez le rat par (Younoszai, Peloso et al. 1969) ; enfin un modèle d'insuffisance placentaire a été développé chez le singe Rhésus en 1971 (Hill, Myers et al. 1971). Depuis, plus de 3000 publications utilisant différents modèles animaux ont été réalisées. Les principales espèces étudiées sont par ordre de fréquence : le rat, la souris, le mouton puis le porc.

## 2) Modèles Nutritionnels

Depuis plus de 30 ans, des manipulations des régimes alimentaires ont été réalisées durant la gestation pour induire un retard de croissance (McMillen and Robinson 2005). Ce type de manipulation peut mimer ce qui se passe dans les pays en voie de développement. Différentes stratégies ont été utilisées : restriction nutritionnelle globale, restriction calorique, restriction protidique isocalorique, régime hypercalorique enrichi en graisses (high-fat), régime pauvre en fer. Ces modèles sont basés sur l'observation que l'apport de nutriments pendant la grossesse est le facteur environnemental déterminant pour l'avenir de la grossesse. L'exemple le plus décrit chez l'Homme est celui de la Grande famine survenue aux Pays Bas en 1944, grâce auquel David Barker a pu établir le lien entre RCIU et syndrome métabolique (Barker, Eriksson et al. 2002).

### a) Restriction nutritionnelle globale

Au 10<sup>ème</sup> jour de gestation, les rates gestantes sont nourries *ad libitum* pour les contrôles ou avec 50% de la quantité ingérée par les témoins pour les rates mises en restriction (Desai, Gayle et al. 2005). Les conséquences à long terme de ce modèle de RCIU sont l'induction d'une obésité à l'âge adulte, d'un diabète et d'une hypertension (Novak, Desai et al. 2006).

### b) Restriction calorique

Plusieurs études ont exploré les effets d'une restriction calorique sévère (70%), modéré (50%) et légère (30%) dans différentes espèces. L'intervention la plus fréquente est une réduction de l'apport calorique de 50%. Chez les rongeurs, une restriction calorique de E15 à E21 ou de E7 à E21 durant la gestation n'affecte pas la durée de la gestation, la taille de la portée ou le taux de mortalité mais diminue significativement le poids de naissance des animaux (Vuguin 2007). A l'inverse, la restriction calorique entre E7 et E14 n'entraîne pas de

modification du poids (Garofano, Czernichow et al. 1998). Une restriction calorique « programme » à l'âge adulte hypertension, altération de la vasodilatation endothéliale, diminution de la masse des cellules  $\beta$  pancréatiques, du nombre d'îlots pancréatique et du contenu en insuline et une diminution de la réponse à l'insuline (Vuguin 2007, McMillen, 2005 #167).

#### c) Restriction protidique

Resnick est le premier à avoir décrit ce modèle et a étudié ses conséquences sur le poids et sur le développement cérébral (Resnick and Morgane 1983). Les rats issus de mères nourries avec un régime hypoprotidique à 6% de caséine ont un retard de croissance pondéral global et cérébral alors que les ratons issus de mères nourries avec un régime hypoprotidique à 8% sont eutrophes et le poids de leur cerveau est comparable à celui des témoins.

Les effets métaboliques de ce modèle de retard de croissance ont été initialement décrits par Snoeck et al. chez des rats qui ont été nourris avec un régime hypoprotidique (8% versus 20%) mais isocalorique (Snoeck, Remacle et al. 1990). La restriction protidique diminue la fécondité ainsi que le développement précoce de l'embryon et sa différenciation chez la souris (Munoz and Bongiorno-Malave 1979) et altère le transfert placentaire d'acides aminés chez le cochon d'Inde (Young and Widdowson 1975). A mi-gestation, la glycémie, l'insuline, la prolactine et le taux de progestérone sont significativement plus bas chez les rates en régime hypoprotidique (Fernandez-Twinn, Ozanne et al. 2003).

Les ratons vont ultérieurement développer une hypertension, un développement pancréatique anormal avec une diminution de la prolifération des cellules  $\beta$ -pancréatiques principalement au niveau de la tête et une diminution de la vascularisation des îlots de Langerhans, entraînant une réponse altérée à l'insuline au test de charge en sucre et une résistance hépatique à l'insuline (McMillen and Robinson 2005).

Une des particularités de ce modèle de retard de croissance est que la composition du régime en elle-même est importante sur le « programming » de la descendance. Les deux régimes les plus couramment utilisés sont le régime « Southampton » et le régime « Hope Farm ». Le régime Southampton programme une hypertension (Langley and Jackson 1994) alors que le régime « Hope Farm » programme une résistance à l'insuline (Ozanne, Smith et al. 1996). La différence entre les deux régimes se situe au niveau de la balance des acides-aminés spécifiques, des graisses et des hydrates de carbone. Le régime « Southampton » contient de l'huile de soja, de la méthionine et des hydrates de carbone (McMillen and Robinson 2005). Le régime « Hope Farm » contient de l'huile de maïs et trois fois plus d'acides gras  $\omega 3$  polysaturés de type acide  $\alpha$  linoléique que le régime Southampton.

## d) Déficit en fer

L'association entre anémie pendant la grossesse et petit poids de naissance a mené à étudier la relation entre le statut ferrique maternel et le développement dans la descendance de pathologies à l'âge adulte (Scholl and Hediger 1994). Les animaux sont nourris avec un régime pauvre en fer (7,5mg/kg d'aliment) ou un régime contrôle (50mg/kg d'aliment) 4 semaines avant l'accouplement et pendant différents stades de gestation. Le déficit en fer n'a pas d'effet sur le poids maternel ou la taille de la portée mais le poids de naissance diminue avec la sévérité du déficit (Gambling, Andersen et al. 2004).

## e) « Over-feeding » chez des brebis gestantes

L'« over-feeding » de brebis gestantes pour faciliter une croissance maternelle rapide durant la gestation est associé avec un risque de prématurité et de déficit de croissance placentaire et fœtale. Le modèle expérimental consiste à donner à des brebis adolescentes gestantes deux fois plus de calories que nécessaire. Ceci résulte à terme en une insuffisance placentaire avec hypoglycémie, hypoinsulinémie et diminution de la croissance fœtale (Redmer, Luther et al. 2009).

3) *Modèles vasculaires chirurgicaux et médicamenteux*

Des interventions chirurgicales ont été mises au point pour générer des modèles de restriction de croissance affectant le placenta et le fœtus.

## a) Ligature bilatérale de l'artère utérine

Ce modèle a été utilisé avec succès chez le rat depuis une trentaine d'années (Ogata, Bussey et al. 1986). Il s'agit d'une ligature bilatérale de l'artère utérine, les animaux contrôles étant issus de femelles ayant subi une anesthésie avec une laparotomie. Les fœtus ayant survécu ont un RCIU, sont hypoxiques, hypoglycémiques et ont une diminution significative de la concentration d'acides aminés type leucine, isoleucine et valine et de l'insulinémie (Ogata, Bussey et al. 1986). Ces animaux développent une résistance à l'insuline et un déficit précoce de sécrétion des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Vuguin, Raab et al. 2004).

## b) Ligature unilatérale de l'artère utérine

Ce modèle a été utilisé chez le rat et le cobaye. Chez le cobaye, le poids des fœtus diminue de 40% mais le poids du cerveau est épargné et le ratio pondéral cerveau/foie est augmenté (Ernst, Salafia et al. 1993). Les conséquences métaboliques de ce modèle ont été peu



ou pas étudiées. Chez le rat, ce modèle provoque un retard de croissance avec des troubles de la myélinisation (Olivier, Baud et al. 2005).

#### c) Embolisation ombilico-placentaire

Ce modèle est principalement décrit chez le mouton avec des durées d'embolisation très variables à partir du 109<sup>ème</sup> jour de gestation, la durée normale de gestation étant de 140 jours. L'embolisation est produite par l'injection quotidienne de microbilles de 15 à 30 µm de diamètre. La conséquence à court terme pour le fœtus sur le plan métabolique est une hypoxie, une augmentation des taux de cortisol et de norépinéphrine et un retard de croissance. C'est le principal modèle utilisé pour décrire les conséquences du RCIU sur le poumon que ce soit pour le surfactant ou pour le devenir à court ou à long terme de la croissance. A long terme, sur le plan métabolique, la principale conséquence est une hypotension artérielle qui dure jusqu'à l'âge de huit semaines chez les animaux RCIU qu'ils soient nés à terme ou prématurés (Cock, Albuquerque et al. 2001).

#### d) Embolisation de l'artère ombilicale

Ce modèle de restriction de croissance a été utilisé chez le mouton. Ce modèle induit une mise en travail prématuré, une hypoxie/hypercapnie et une hypercortisolémie chez les fœtus (Supramaniam, Jenkin et al. 2006).

#### e) Caronculectomie

La caronculectomie consiste en l'ablation de caroncules qui déterminent au final la taille du placenta. Ce modèle chirurgical est réalisé avant toute gestation chez la brebis, créant un placenta de petite taille plus qu'une altération de la capacité de transfert ou du milieu hormonal (Orgeig, Crittenden et al. 2005).

#### f) Restriction de croissance par administration d'un inhibiteur de la NO synthase : le L-NAME

L'inhibition de la NO synthase provoque une diminution de la production du monoxyde d'azote, puissant agent vasodilatateur. Durant la gestation, l'administration d'un inhibiteur de la NO synthase provoque une diminution de la perfusion fœtale et placentaire (Neerhof, Synowiec et al. 2011). L'administration de L-NAME provoque également une augmentation du taux maternel circulant d'endothéline, vasoconstricteur puissant (Neerhof, Synowiec et al. 2011). Cependant, l'effet du L-NAME sur la croissance fœtale est réversible à l'arrêt du traitement (Neerhof, Synowiec et al. 2011). De même, la perfusion de L-NAME

à des rates gestantes ne provoque aucune conséquence métabolique à long terme sur la descendance (Butruille, Mayeur et al. 2013).

#### 4) *Autres modèles*

##### a) Hypoxie gestationnelle

Les rates gestantes sont placées en hypoxie avec une concentration en oxygène comprise entre 9,5 et 14%. On observe une diminution de la taille de la portée et un RCIU chez le fœtus. Une réponse spécifique d'organe a pu être observée (Huang, Vo et al. 2004). La réponse dépend également de la durée de l'hypoxie. Cependant, des gènes reliés à l'homéostasie calcique et aux protéines du cytosquelette sont constamment up-régulés alors que les gènes reliés aux protéines G, à la croissance, au transport ionique sont toujours down-régulés (Huang, Vo et al. 2004).

##### b) Stress maternel

L'exposition des femelles gestantes à un stress physique comme une diminution de leur espace plusieurs fois par jour (Lesage, Del-Favero et al. 2004), une hyperthermie (Thorn, Brown et al.) ou l'exposition à un environnement acoustique bruyant à la fin de la première semaine de gestation chez la souris (Haque, Izumi et al. 2004) induit un RCIU. A long terme, le stress physique induit une intolérance glucidique (Lesage, Del-Favero et al. 2004). Les conséquences à long terme du RCIU induit par hyperthermie maternelle n'ont pas été étudiées à ce jour.

##### c) Restriction de croissance par injection de glucocorticoïdes

Chez l'animal, l'effet sur le poids de naissance augmente avec le nombre d'injections de glucocorticoïdes ou si les glucocorticoïdes sont donnés en fin de gestation (Nyirenda, Lindsay et al. 1998, Pratt, Magness et al. 1999). L'injection de glucocorticoïdes programme dans la descendance une intolérance au glucose (Nyirenda, Lindsay et al. 1998) mais pas d'hypertension artérielle à l'âge adulte (McDonald, Franko et al. 2003).

## Chapitre 4 : RCIU, maturation et développement pulmonaire

Dans les espèces avec une gestation relativement longue, comme c'est le cas chez l'Homme, le développement de l'architecture pulmonaire survient durant la vie fœtale et post-natale précoce et peut être influencée par de nombreux facteurs physiques, métaboliques endocriniens et inflammatoires *in utero*. Tout stimulus ou agression survenant durant la vie fœ-

tales ou post-natale précoce peut altérer de façon permanente la structure ou la physiologie du système respiratoire avec des conséquences possibles à long terme. L'hypothèse d'une origine fœtale du développement de la Santé et des Maladies (DOHaD) est la suivante : un environnement intra-utérin inadapté qui a comme conséquence un RCIU prédispose les individus au développement d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive à l'âge adulte (Barker, Chest 1999). En outre, de nombreuses études épidémiologiques ont montré au cours de la dernière décennie, l'association entre un RCIU et une augmentation de la fréquence de la DBP. Une méta-analyse incluant 154 323 enfants mais seulement 516 RCIU a montré une augmentation du risque de complications respiratoires, toutes complications confondues (recours à une intubation ou présence de signes de détresse respiratoire ou encore radiologiques) en période néonatale en cas de RCIU (Damodaram, Story et al. 2011).

## I-Conséquences à court terme : surfactant et maladie des membranes hyalines

Historiquement, les nouveau-nés avec un RCIU étaient considérés comme protégés par leur petit poids du risque de développer une maladie des membranes hyalines. Cependant, ceci était probablement lié à l'absence de prise en compte du terme de naissance dans les études nord-américaines qui englobent dans leur population de « Very Low Birth Weight » des enfants eutrophes et des RCIU. L'hypothèse physiopathologique sous-jacente était qu'en cas de RCIU, le fœtus sécrète des hormones de stress dont des glucocorticoïdes connus pour stimuler la synthèse de surfactant (Economides, Nicolaides et al. 1988). En 1995, Tyson a montré sur une cohorte canadienne de 28 838 enfants que le risque de développer une maladie des membranes hyalines était multiplié par 5,84 [3,07-8,71] en cas de RCIU avec estimation obstétricale de l'âge gestationnel et analyse des facteurs confondants (Tyson, Kennedy et al. 1995). Cette étude a profondément changé la vision des néonatalogistes sur l'effet protecteur pulmonaire du RCIU.

Depuis, plusieurs études ont montré soit un effet protecteur du RCIU (Spinillo, Capuzzo et al. 1997) soit un effet aggravant (Bartels, Kreienbrock et al. 2005) sur la survenue d'une maladie des membranes hyalines. D'autres ont montré un effet différent en fonction du terme de naissance, aggravant avant 28SA et protecteur entre 29 et 32SA (Ley, Wide-Svensson et al. 1997). Plus récemment, dans une population de 210 enfants dont 51 RCIU,

l'existence d'un RCIU n'a pas été retrouvé comme un facteur modifiant significativement le risque de MMH (Giapros, Drougia et al.). Cependant toutes ces études ont comme limite un nombre de patients bien moindre que l'étude de Tyson.

*1) Les dopplers intra-utérins ont-ils un caractère prédictif de la fonction pulmonaire en cas de pathologie maternelle vasculaire ?*

Une augmentation de l'incidence de la maladie des membranes hyalines a été retrouvée chez les nouveau-nés ayant un index de pulsatilité de l'artère utérine ou une absence de flux diastolique dans l'artère ombilicale (Soregaroli, Bonera et al. 2002). Cependant cette étude ne réalise pas d'étude multivariée et les nouveau-nés servant de contrôles avec des index dopplers normaux n'ont pas le même âge gestationnel. Depuis, d'autres études ont été menées, et lorsque l'âge gestationnel et le RCIU sont pris en compte en analyse multivariée, la présence d'un flux doppler absent ou « reverse » dans l'artère ombilicale est un facteur prédictif de maladie des membranes hyalines avec un *odds ratio* à 2,4 dans plusieurs études (Torrance, Derks et al. 2009, Lakshmi, Pramod et al. 2013).

*2) Evaluation biologique de la maturation du surfactant : rapport Lécithine / Sphingomyéline ou comptage des corps lamellaires*

Le rapport Lécithine sur Sphingomyéline (L/S), témoin indirect de la maturation pulmonaire, est significativement plus élevé dans le liquide amniotique des fœtus porteurs d'un RCIU d'origine vasculaire par rapport aux fœtus RCIU d'une autre origine, témoignant d'un possible effet accélérateur de l'insuffisance placentaire sur la maturation pulmonaire (Torrance, Voorbij et al. 2008). Autre mesure, le comptage des corps lamellaires dans le liquide amniotique, plus facile techniquement à réaliser montre encore une fois une grande diversité dans les résultats mais les groupes étudiés et les contrôles sont très variables (Stimac, Petrovic et al.). La dernière étude sur le sujet montre une diminution significative du nombre de corps lamellaires chez les patients RCIU associés à une prééclampsie maternelle entre 31 et 36SA (Stimac, Petrovic et al.).

*3) Corticothérapie anténatale pour RCIU*

L'administration de corticoïdes en période anténatale pour accélérer la maturation fœtale a été largement étudiée. Le suivi des enfants eutrophes ayant été exposé à une cure de corticoïdes n'a pas montré d'effet délétère (Dalziel, Lim et al. 2005, Dalziel, Walker et al. 2005). Le traitement anténatal des femmes à risque d'accoucher prématurément fait désormais consensus. Cependant, depuis la première étude de Liggins et Howie en 1972, les fœtus RCIU ont été exclus de tous les larges essais randomisés. Dans une méta-analyse portant sur 8 études (3 sur le RCIU et 5 sur les « small for gestational age » (SGA)) aucune différence n'a été notée entre les groupes pour la survenue d'une maladie des membranes hyalines pour les RCIU (OR : 1.1 ; IC95:0,7-1,71) ou pour les SGA (OR : 0,76 ; IC95 : 0,52-1,11) (Torrance, Derks et al. 2009). Cependant, seules deux études ont été menées en prospectif et aucune étude randomisée n'a été conduite dans cette population. La question de la corticothérapie anténatale dans cette population n'est pas complètement résolue.

#### *4) Chez l'animal*

La synthèse du surfactant a été évaluée de façon indirecte par l'expression des ARNm (acides ribonucléiques messagers) pour SP-A, -B et -C et des protéines elles-mêmes. Les études ont été réalisées sur différents modèles et différentes espèces. Les résultats dépendent du modèle de RCIU, de l'espèce étudiée et du « timing » choisi pour induire le RCIU.

## II- Conséquences à moyen terme : anomalies de l'alvéolisation et DBP

### *1) Epidémiologie chez l'Homme*

Le RCIU, toutes causes confondues, a été reconnu seulement récemment comme facteur de risque de DBP. Dans une étude anglaise en population portant sur plus de 4 000 enfants nés à moins de 32 SA entre 1995 et 1999, le risque relatif de présenter une DBP en cas de RCIU est près de 3 fois celui de la population de référence (poids de naissance entre le 25<sup>ème</sup> et le 75<sup>ème</sup> percentile) (Lal, Manktelow et al. 2003). Une étude australienne et néo-zélandaise retrouve dans une population de même terme de plus de 11 000 enfants, un risque augmenté par 6 de DBP (Henderson-Smart, Hutchinson et al. 2006). L'étude européenne en population MOSAIC, réalisée dans 10 pays et regroupant plus de 4 500 enfants nés en 2003 observe, à nouveau, un risque relatif de DBP augmenté par 6 chez les RCIU. Plus encore, le risque de DBP diminue de façon inversement proportionnelle au poids de naissance (Zeitlin,

El Ayoubi et al. 2010). Chez les enfants nés avant 28SA, le risque de DBP augmente quand le poids de naissance est inférieur au poids médian (Kewitz, Wudel et al. 2008).

Au cours des cinq dernières années, le RCIU secondaire à une prééclampsie a été plus particulièrement reconnu comme facteur de risque plus spécifique de DBP. L'étude de Hansen montre une augmentation du risque de DBP cependant de nombreux facteurs confondants ne sont pas pris en compte dans cette étude dont la persistance du canal artériel (Hansen, Barnes et al. 2010). L'étude de Durrmeyer *et al.* confirme les données précédentes montrant qu'une grossesse compliquée par des anomalies vasculaires à type de prééclampsie ou de HELLP Syndrome augmente le risque de DBP (Durrmeyer, Kayem et al. 2011). Récemment, la corrélation entre sévérité des symptômes de prééclampsie et sévérité de la DBP a été montrée (Ozkan, Cetinkaya et al. 2012).

## 2) Chez l'animal

### a) Analyse morphométrique chez le mouton

Une restriction de croissance durant la vie fœtale peut également altérer l'architecture pulmonaire. Chez le mouton, deux équipes se sont intéressées au développement pulmonaire en cas de RCIU. L'étude de Lipsett *et al.* réalisée chez des agneaux avec RCIU induit par diminution de la surface d'échange placentaire par caronculectomie pré-gestationnelle montre que la surface d'échange gazeux est diminuée de 10% ( $p < 0,05$ ) à la naissance (Lipsett, Tamblyn et al. 2006).

Dans un modèle de RCIU d'origine vasculaire induit par embolisation ombilico-placentaire quotidienne de micro-billes entre le 120<sup>ème</sup> jour de vie intra-utérine jusqu'au terme (147 jours), Maritz a montré qu'il n'y avait pas d'anomalie de l'alvéolisation durant la vie intra-utérine (J140) alors qu'il existe à 8 semaines de vie une diminution de 31% du nombre d'alvéoles. Dans cette étude, il existe également un épaississement des *septa* (73% plus larges à 8 semaines) dans la vie post-natale (Maritz, Cock et al. 2004) alors qu'il n'est pas observé au 140<sup>ème</sup> jour de la vie intra-utérine (Maritz, Cock et al. 2001). L'épaisseur de la barrière gaz-sang est elle aussi augmentée (47% à 8 semaines). Cette augmentation d'épaisseur est liée à une augmentation de dépôt de la matrice extracellulaire.

Ces deux modèles discordants dans leur façon d'induire un retard de croissance, sont aussi discordants pour leurs conséquences sur le développement pulmonaire. L'inconvénient

du modèle « mouton » est que, contrairement à l'Homme, l'alvéolisation est terminée à la naissance.

#### b) Etude de la morphométrie pulmonaire chez le rat

Deux modèles différents de restriction de croissance intra-utérine ont été étudiés chez le rat durant la période de l'alvéolisation: l'administration d'un inhibiteur de la NO synthase, le L-NAME et un modèle de ligature bilatérale de l'artère utérine.

Le L-NAME a été administré à des rates gestantes du 14<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'au terme (E21) par voie orale de façon quotidienne à la dose de 50mg/kg/jour (Diaz, Lebras-Isabet et al. 2005). Les résultats sont les suivants :

- à la naissance, la surface alvéolaire totale, et la densité de surface alvéolaire sont inférieures dans le groupe L-NAME alors que la taille des alvéoles est significativement augmentée ;
- au 7<sup>ème</sup> jour de vie post-natale, la surface alvéolaire totale est diminuée dans le groupe L-NAME par rapport aux témoins ;
- à la fin de l'alvéolisation soit au 21<sup>ème</sup> jour de vie, tous les paramètres sont équivalents dans les groupes L-NAME et témoins (Diaz, Lebras-Isabet et al. 2005).

Ces résultats suggèrent que la croissance post-natale peut corriger complètement les anomalies de l'alvéolisation observées à la naissance.

Ce même schéma de réparation est observé dans le modèle de ligature bilatérale de l'artère utérine utilisé par l'équipe de L Joss-Moore et K. Albertine. Le jour de la naissance, l'analyse des coupes histologiques de poumons de rats montre une multiplication par 1,7 de l'épaisseur septale des espaces aériens distaux (O'Brien, Barnes et al. 2007), mais, une analyse complémentaire a montré que ce retard d'alvéolisation concernait uniquement les animaux femelles. A P14 et à P21, l'alvéolisation est comparable entre les animaux RCIU et les animaux contrôles (Joss-Moore, Carroll et al. 2013). Cependant, les auteurs ont considéré comme ayant un retard de croissance les animaux dont le poids est inférieur de 25% par rapport aux contrôles. Cette définition est peu courante et masque peut être des différences sur les animaux les plus petits.

#### c) Voies aériennes

Les voies aériennes sont elles aussi modifiées : à 8 semaines, il existe une anomalie du cartilage et du développement épithélial avec des voies aériennes plus fines, une diminution du nombre de glandes sous-muqueuses ainsi qu'une augmentation de la quantité de mucus

(Wignarajah, Cock et al. 2002). Ceci a été observé dans un modèle ovin d'embolisation ombilico-placentaire à partir du 120<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire.

#### d) Mécanismes moléculaires

Ils sont mal connus car très peu étudiés.

##### i) Anomalies de la synthèse d'élastine

Chez le mouton, Cock a utilisé un modèle de RCIU par injection ombilico-placentaire à E116 ou E118 de microsphères jusqu'au moment où la saturation fœtale a été réduite de 50%. Le taux d'ARNm codant pour la tropo-élastine ne diffère pas entre les groupes, que ce soit pendant la vie intra-utérine (E128 ou E140) ou 8 semaines après la naissance. Les concentrations d'élastine sont également les mêmes, en dehors d'une discrète diminution à E140 totalement réversible ensuite (Cock, Joyce et al. 2004).

Chez le rat, en cas de ligature bilatérale de l'artère utérine, le taux d'ARNm codant pour l'élastine est significativement diminué chez les animaux RCIU à P0 et à P7 mais comparable entre les RCIU et les témoins à P21. De même, de nombreux gènes essentiels pour la synthèse de l'élastine (TGF- $\alpha$  et - $\beta$ , fibrilline 1, fibuline-1 et lysyl oxydase) ont des ARNm en quantité diminuée à P0 et à P7 mais pas à P21. La quantification, après coloration de Hart, montre que la quantité de fibres élastiques est significativement diminuée à P21 mais pas à P0 ou P7. Le taux d'élastase est le même, à P21, entre les groupes RCIU et contrôle (Joss-Moore, Wang et al. 2011). Cependant, dans cette étude, l'analyse morphométrique n'a pas été réalisée en parallèle ce qui rend difficile l'interprétation de la densité réelle des fibres élastiques.

Dans un modèle de RCIU induit par restriction nutritionnelle chez la rate gestante, l'expression et l'abondance de l'élastine ainsi que celles de l'actine musculaire lisse sont significativement augmentées chez les animaux RCIU à 9 mois de vie (Rehan, 2011) tant pour l'ARNm que pour les protéines elles-mêmes mesurées par Western blot. A P21, seule l'analyse en immunohistochimie montre une augmentation de la quantité d'élastine. Cependant, il s'agit d'une impression car aucune quantification n'est réalisée. Les fibroblastes de rat, issus des poumons d'animaux RCIU, prélevés à E19 puis mis en culture présentent une augmentation de l'expression d'élastine (ARNm) (Rehan, Sakurai et al. 2009).

##### ii) Etude des phénomènes apoptotiques

L'étude des phénomènes apoptotiques dans le modèle de ligature bilatérale de l'artère utérine montre qu'il existe une diminution de la phosphorylation de la sérine-15P de p53 qui est sa forme active, principalement dans les espaces aériens distaux. p53 est un facteur de transcription régulant certaines fonctions cellulaires importantes comme la mitose ou



l'apoptose. Ceci a comme conséquence, le jour de la naissance, une diminution des cibles pro-apoptotiques de p53 (Bax, Apaf et Gadd45) et une augmentation des cibles anti-apoptotiques comme Bcl-2 (O'Brien, Barnes et al. 2007). En cas de RCIU, le ratio quantité d'ADN/ $\mu$ g de tissu est paradoxalement diminué ainsi que le ratio ADN/ $\mu$ g de protéine (O'Brien, Barnes et al. 2007). Cependant, dans ce modèle il n'y a pas de trouble de l'alvéolisation durable (Joss-Moore, Carroll et al. 2013).

### iii) Importance du VEGF et de son récepteur soluble circulant VEGFR-1 (sFlt-1)

De nombreux travaux ont montrés l'importance du VEGF dans le développement pulmonaire normal. L'injection de sFlt-1 dans les sacs amniotiques de rats à E20, perturbe l'alvéolisation normale, augmente l'apoptose et diminue la croissance vasculaire pulmonaire. De plus, les rats exposés développent une hypertrophie secondaire des ventricules droit et gauche en période post-natale (P14) (Tang, Karumanchi et al. 2011). Il existe parallèlement une suppression de l'activité de VEGF-R2 dans les cellules endothéliales et mésenchymateuses pulmonaires (Tang, Karumanchi et al. 2011).

### iv) Approche de type gène-candidat

Igf2 est connu pour intervenir dans la croissance et le développement fœtal. Les souris *Igf2*<sup>-/-</sup> ont un RCIU sévère. L'étude de souris mutantes *Igf2*<sup>-/-</sup> montre que ces souris homozygotes ont des poumons qui semblent rester au stade pseudo-glandulaire plus longtemps avec moins d'espaces sacculaires et plus de mésenchyme à E17. A E18, les espaces sacculaires sont moins nombreux et les septas inter-alvéolaires sont plus épais (Silva, Venihaki et al. 2006). Ceci laisse à penser que les molécules d'Insulin-like Growth Factor participent aussi à la croissance pulmonaire fœtale.

### c) Epreuves fonctionnelles respiratoires

En parallèle d'une diminution de la quantité d'élastine il existe, chez le rat avec un RCIU induit par une ligature bilatérale de l'artère utérine, une augmentation de la compliance pulmonaire statique sur les courbes pression-volume (Joss-Moore, Wang et al. 2011).

Chez le mouton ayant subi une embolisation ombilico-placentaire entre E120 et le terme, les épreuves fonctionnelles respiratoires montrent une augmentation de la ventilation-minute chez les animaux RCIU, une augmentation de la consommation d'oxygène rapportée au poids, une diminution de la DLCO, une diminution de la compliance pulmonaire persistant jusqu'à la 8<sup>ème</sup> semaine de vie post-natale. Ces résultats sont compatibles avec l'altération de

la fonction respiratoire observée chez les nourrissons et les enfants dans les suites d'un RCIU (Joyce, Louey 2001).

#### d) Essais thérapeutiques pré-cliniques

Partant du postulat que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est indispensable à la transition épithélio-mésenchymateuse du poumon en développement, un traitement par l'acide docosahexaénoïque (DHA) a été administré à des rats ayant un RCIU induit par une ligature bilatérale de l'artère utérine. En effet, les souris ayant une invalidation du gène PPAR $\gamma$  ont une altération de leur développement pulmonaire post-natal et des changements d'expression des gènes mésenchymateux (Simon, Arian et al. 2006). En outre, PPAR $\gamma$  est un composant essentiel de la boucle épithélio-mésenchymateuse liée à l'hormone parathyroïde (PTHrP) qui contribue également au développement pulmonaire (Bourbon, Boucherat et al. 2005). Le DHA est un acide gras polyinsaturé  $\omega$ 3, son taux sanguin circulant est diminué en cas de RCIU. En cas de RCIU, l'expression en ARNm d'un des variants de PPAR $\gamma$  est diminuée et la supplémentation en DHA restaure une expression normale de PPAR $\gamma$ . Une des cibles de transcription directe de PPAR $\gamma$  est Setd8, une enzyme de modification épigénétique. Le RCIU diminue l'expression des ARNm de Setd8 ainsi que la quantité de protéines de Setd8 au niveau du poumon chez les mâles uniquement. La supplémentation en DHA restaure une quantité normale de Setd8 (Joss-Moore, Wang et al. 2010). Cependant cette étude est uniquement biochimique dans un modèle qui ne donne pas de trouble de l'alvéolisation (Joss-Moore, Carroll et al. 2013).

### III- Conséquences à long terme : homme et animal

Peu d'études se sont intéressées à l'évolution respiratoire à long terme des animaux atteints de RCIU alors que de nombreuses études ont été menées tant sur le plan cardiovasculaire que sur le plan rénal, notamment dans le cadre d'une augmentation du risque de développer un syndrome métabolique (McMillen and Robinson 2005).

#### 1) Chez l'Homme

Les conséquences respiratoires à long terme du RCIU ont été étudiées grâce aux épreuves fonctionnelles respiratoires. Greenough a montré que les résistances des voies aériennes étaient plus élevées chez les enfants âgés de 10 mois, anciens RCIU, après avoir écarté l'effet confondant de la prématurité (Greenough, Yuksel et al. 2004). Chez des enfants d'âge scolaire (8,4 ans (6,5-10)), les 31 enfants nés prématurément et ex-RCIU testés ont un

volume expiratoire maximal seconde (VEMS), un rapport de Tiffeneau (VEMS/CVF) et un débit expiratoire moyen (DEM25-75) significativement plus bas que les nouveau-nés à terme. Après prise en compte de la prématurité, excepté pour les nouveau-nés d'âge gestationnel supérieur à 26SA à la naissance, cet effet ne persiste pas. Cependant, il s'agit d'une analyse secondaire en sous-groupe (Morsing, Gustafsson et al. 2011). Chez des enfants RCIU de 7 à 15 ans, issus de grossesses multiples, une étude retrouve l'augmentation des résistances des voies aériennes avec une diminution du débit expiratoire maximal (DEM50) (Nikolajev, Heinonen et al. 1998).

Ces anomalies perdurent. Ainsi, une étude réalisée chez des adultes nés à terme montre que pour chaque « tranche » de 500g de plus à la naissance il existe une amélioration du VEMS et de la capacité vitale forcée (CVF) (Canoy, Pekkanen et al. 2007).

Les études sur la symptomatologie respiratoire de type wheezing ou asthme manquent pour le RCIU lui-même car ces études prennent en compte les enfants de très petit poids de naissance (VLBW) sans tenir compte de l'âge gestationnel à la naissance. De plus, aucune de ces études n'a pris en compte dans son analyse les antécédents de DBP.

## *2) Chez l'animal: Etude de la morphométrie et de la fonction pulmonaires*

Un RCIU induit chez le mouton par embolisation ombilico-placentaire entraîne une modification permanente de l'alvéolisation avec un nombre diminué d'alvéoles et une surface alvéolaire réduite chez les RCIU par rapport aux témoins à l'âge de 2 ans (Maritz, Cock et al. 2004). La restriction protidique maternelle *in utero* chez le rat a comme conséquence à P70 de vie une diminution de la compliance pulmonaire de 40% par rapport aux témoins (Alejandre Alcazar, Morty et al.). Mais ces résultats sont à nuancer par l'analyse de la morphométrie pulmonaire qui retrouve, à l'inverse des précédents modèles, une augmentation de l'alvéolisation. Dans ce modèle, la mesure des résistances des voies aériennes montre une augmentation de celles-ci à P28 de vie et à P70 avec une hyperréactivité bronchique (Alejandre Alcazar, Ostreicher et al.).

Dans un modèle de restriction nutritionnelle globale de 50% chez la rate gestante, les animaux RCIU âgés de 9 mois ont des résistances des voies aériennes de base identiques à celle des témoins. Par contre après test à la méta-choline, les résistances des voies aériennes augmentent par rapport aux témoins (Rehan, 2011). La compliance pulmonaire est significativement diminuée chez les animaux RCIU à 9 mois par rapport aux témoins (Rehan, 2011).

## Partie 2 : objectifs et conception de l'étude

---

L'objectif principal de ce travail est de mieux comprendre les anomalies du développement alvéolaire dans le cadre d'un RCIU. L'approche choisie a été mixte à la fois fondamentale et clinique.

### I-Etude fondamentale

En ce qui concerne la partie fondamentale de ce travail, la première partie du travail a consisté à identifier un modèle de RCIU donnant des anomalies de l'alvéolisation durables. Pour ce, nous avons bénéficié de la collaboration de trois équipes françaises ayant travaillé préalablement sur le RCIU. Etant donné les résultats discordants obtenus dans les études précédentes dans plusieurs espèces, nous avons choisi de nous intéresser à une seule espèce animale : le rat Sprague Dawley.

Nous avons choisi d'étudier :

- le modèle de restriction de croissance par restriction protidique déjà utilisé et décrit par l'équipe d'U Simeoni. Ce régime comporte 9% de protides provenant de la caséine contre 23% dans le régime contrôle. Les régimes sont iso-caloriques grâce à l'augmentation du ratio d'amidon de maïs dans le régime hypoprotidique.

Ce régime est administré pendant toute la durée de la gestation à la mère et poursuivi jusqu'à deux jours après la naissance. Les ratons restent avec leur propre mère jusqu'à leur sacrifice post-natal. Les portées sont homogénéisées à 10 pour diminuer le risque d'apparition d'un retard de croissance extra-utérin ;

- le modèle de restriction de croissance par L-NAME déjà utilisé et décrit par l'équipe des Pr Storme et Deruelle : implantation d'une pompe mini-osmotique par voie sous-cutanée en inter-scapulaire. La pompe délivre en continu le L-NAME ou du sérum physiologique. L'insertion est réalisée sous anesthésie générale au 17<sup>ème</sup> jour de gestation. Au deuxième jour de vie post-natale, les ratons sont adoptés. Les portées sont homogénéisées pour diminuer le risque d'apparition d'un retard de croissance extra-utérin ;

- le modèle de ligature unilatérale de l'artère intra-utérine décrit par l'équipe du Pr Baud. Au dix septième jour de vie, la rate est anesthésiée et l'artère utérine droite est ligaturée après la première arcade. Les rats restent avec leur propre mère jusqu'à leur sacrifice post-natal.

En fonction des laboratoires où les manipulations ont été effectuées les rats provenaient de l'animalerie Charles River (Modèle restriction protidique) ou de l'animalerie Janvier (Modèle ligature unilatérale de l'artère utérine ou modèle L-NAME).

Afin d'étudier le développement alvéolaire dans sa globalité et là encore en raison des résultats discordants entre les différentes études, nous avons étudié les poumons en morphométrie (analyse histologique) avant, pendant et à la fin de l'alvéolisation, c'est-à-dire respectivement aux 4<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours de vie post-natale.

En cas de trouble de l'alvéolisation, une analyse génomique a été réalisée par qPCR selon une approche gène candidat concernant 13 des principaux gènes impliqués dans l'alvéolisation que ce soit dans la formation des alvéoles elles-mêmes ou dans le développement vasculaire.

La deuxième partie de l'étude fondamentale s'est intéressée au modèle de restriction de croissance intra-utérine induit par restriction protidique. Une approche multi-génique a été menée aux trois temps du développement alvéolaire préalablement décrits (4<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours de vie post-natale). Des puces à ARN Agilent ont été réalisées dans les poumons totaux poolés.

En fonction des résultats génomiques obtenus une analyse protéique complémentaire ainsi qu'une analyse histologique ont été réalisées.

## II- Approche clinique

Une base de recueil de données a été constituée dans le service de Médecine Néonatale de Port-Royal pour effectuer un travail de recherche préliminaire sur le lien entre DBP et RCIU chez des enfants nés d'une grossesse compliquée par des anomalies vasculaires (prééclampsie, dopplers utérins pathologiques) nés à la maternité Port-Royal à un terme inférieur à 28SA entre 2005 et 2009. Ce travail a été effectué dans le cadre d'une thèse de Médecine par MS Aubelle (Chef de Clinique dans le service de Médecine Néonatale). Cette base de données,

validée, regroupe l'ensemble des complications néonatales classiquement observées en cas de RCIU et les données maternelles. Etant donné le lien fort retrouvé entre RCIU et DBP dans cette étude, avec une multiplication du risque de DBP par 6 en cas de RCIU, un projet de recherche clinique a été élaboré pour étudier le lien entre facteurs anti-angiogéniques circulants et DBP. Ce projet a bénéficié du soutien financier de l'AP-HP, promoteur de l'étude, dans le cadre d'un contrat de recherche clinique obtenu en 2011, sous la direction scientifique du Pr J Guibourdenche. Les patientes atteintes de prééclampsie avant 30SA, dont le fœtus est porteur de RCIU, sont recrutées à la maternité Port-Royal (maternité de type III, 6 000 naissances/an) ou à l'hôpital Robert Debré (maternité de type III) avant l'accouchement.

### *1) Hypothèse et objectifs*

#### *a) Hypothèse principale*

Les récepteurs solubles, sFlt-1 et sEng sont sécrétés par le placenta et passent dans la circulation fœtale où ils bloquent leurs ligands respectifs, le VEGF et le TGF- $\beta$ . La diminution consécutive de la fraction libre de ces ligands perturberait le développement pulmonaire normal.

#### *b) Objectifs :*

- mesurer le taux de sFlt1 dans le sang maternel et regarder s'il est corrélé à l'existence d'une DBP à 36SA chez les prématurés nés avant 30SA, atteints de RCIU à la suite d'une prééclampsie.
- déterminer si une concentration élevée de récepteurs solubles circulants et une concentration diminuée de leurs ligands dans le sang fœtal et maternel et/ou dans le liquide amniotique est corrélée avec la survenue d'une DBP ainsi que les complications les plus fréquentes observées en cas de RCIU (thrombopénie, entérocolite ulcéro-nécrosante, infection ...)

A terme, le but de cette étude est d'identifier précocement les nouveau-nés à risque de développer une DBP afin d'envisager des thérapeutiques précoces et ciblées sur les enfants les plus à risque.

### *2) Modalités pratiques*

#### *a) Prélèvements*

En cas de prééclampsie, les mères sont hospitalisées pour surveillance clinique (notamment de la pression artérielle) et biologique (fonctions hépatique et rénale et numération for-

mule sanguine). Au cours d'un des prélèvements maternels, lors de l'hospitalisation et au moment de l'anesthésie pré-opératoire, un tube supplémentaire sera prélevé. Au moment de la césarienne, un prélèvement de sang de cordon et de liquide amniotique sera également réalisé.

#### b) Dosages et méthodes de dosage

Le sFlt-1, le VEGF, le PlGF et la sEng seront dosés par technique ELISA grâce à des kits (Enzyme-linked immunosorbent assay) conformément aux instructions du laboratoire R&D.

### 3) Confrontation entre les données biologiques et cliniques

#### a) Base de données

Il s'agit d'une base Epi-Info conforme à celle mise au point par le Dr Aubelle.

#### b) Critères d'inclusion et de non-inclusion

Les critères d'inclusions sont les suivants: patiente enceinte de moins de 30SA et atteinte de prééclampsie, dont le fœtus est atteint de RCIU à l'échographie obstétricale, âgée de plus de 18 ans et bénéficiaire (ou ayant droit) de la Sécurité Sociale. L'existence de pathologies inflammatoires maternelles ou fœtales, la présence de signes cliniques ou biologiques d'infection et un fœtus eutrophe sont des critères de non inclusion.

Le protocole sera proposé à 60 mères, pour tenir compte des éventuels refus d'inclusion, des données manquantes et du taux élevé de mortalité précoce chez les enfants atteints de RCIU. En effet, le diagnostic respiratoire n'étant fait qu'à 36SA d'âge corrigé, le décès précoce de certains enfants les fera sortir de l'étude.

#### c) Nombre de sujets nécessaires et analyse statistique

Selon des résultats préliminaires, 50 % des prématurés hypotrophes nés avant 30SA et issus de mères pré-éclamptiques sont atteints de DPB à 36SA. Notre hypothèse est que le taux moyen de sFlt-1 dans le sang maternel est deux fois plus élevé, environ 6000 pg/ml chez les prématurés atteints de DPB. Le nombre de sujets nécessaires pour montrer un doublement de la moyenne de sFlt-1 dans le sang maternel chez les RCIU avec DPB issus de mère pré-éclamptiques par rapport à la moyenne des RCIU sans DPB issus de mère pré-éclamptiques (< 30 SA) avec un risque de première espèce de 0,05 et une puissance de 80 % (test bilatéral) et un écart-type de 2500 pg/ml est de 12 enfants dans chaque groupe.

L'ensemble de ces données sera analysé en univarié puis en multivarié. Un t-test de Student de comparaison sera effectué entre les deux groupes (avec ou sans DPB) pour comparer les taux des différents marqueurs biologiques étudiés. Une différence significative sera notée si  $p < 0,05$ . L'analyse statistique sera effectuée grâce au logiciel SAS.

## Partie 3: Résultats

---

La partie « Résultats » comprend des articles (publié ou soumis).

J'ai réalisé des articles de revue de la littérature, les publications correspondantes sont dans la partie « annexe »



# **Article 1**

## **Effects of two models of intra-uterine growth restriction in rat lungs: morphometric and gene expression analysis**

## Résumé

---

Dans ce premier article, nous avons voulu identifier quel modèle de RCIU était responsable d'anomalies durables du développement alvéolaire. Nous avons donc comparé le modèle « L-NAME » et le modèle « restriction protidique » chez des rats Sprague-Dawley.

Nous avons réalisé une étude complète de la morphométrie pulmonaire à différents temps du développement alvéolaire : avant, pendant et après l'alvéolisation. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier par une approche de type gène-candidat, quels étaient les facteurs de croissance, classiquement décrits dans la formation de nouvelles alvéoles et l'angiogenèse, modifiés dans les troubles de l'alvéolisation, induits par ces modèles, aux trois temps précédemment décrits.

### Résultats :

Les modèles utilisés induisent tous les deux un retard de croissance. Les ratons, allaités pendant toute la période d'étude, ont un rattrapage pondéral complet au 21<sup>ème</sup> jour de vie post-natale. Les ratons du groupe L-NAME ont un poids significativement plus élevés que les témoins à P21.

Les résultats de la morphométrie pulmonaire sont différents entre les deux modèles utilisés. Dans le groupe restriction protidique, le développement alvéolaire est comparable en terme de morphométrie au quatrième jour de vie post-natale chez les animaux porteurs d'un RCIU par rapport aux témoins. Dès le 10<sup>ème</sup> jour de vie, des anomalies de l'alvéolisation apparaissent et persistent dans le temps. Dans le groupe L-NAME, il existe des troubles de l'alvéolisation précoce (P4) qui se corrigent spontanément avant P10.

L'analyse transcriptomique, dans le groupe restriction protidique, montre qu'aucun des facteurs de croissance alvéolaire ou vasculaire n'est modifié par rapport aux témoins aux trois temps étudiés. Dans le groupe L-NAME, au 4<sup>ème</sup> jour, plusieurs gènes impliqués dans l'alvéolisation (MMP14 et 16, PDGF, FGF-R4) ont des taux d'ARNm diminués par rapport aux témoins ainsi que ceux du VEGF et de ses deux récepteurs (VEGFR-1 et -R2). Au 10<sup>ème</sup> jour, les ARNm des gènes impliqués dans l'alvéolisation (MMP14, FGF7, FGF18 ainsi que leurs récepteurs FGF-R3 et -R4) sont diminués tout comme le VEGF. Au 21<sup>ème</sup> jour de vie, ce sont les taux d'ARNm des MMP14 et 16 qui sont significativement diminués et le taux d'ARNm de l'adrénomédulline est significativement augmenté dans le groupe L-NAME.

# Effect of Two Models of Intrauterine Growth Restriction on Alveolarization in Rat Lungs: Morphometric and Gene Expression Analysis

Elodie Zana-Taieb<sup>1,2,3,9\*</sup>, Laura Butruille<sup>4</sup>, Marie-Laure Franco-Montoya<sup>5</sup>, Emmanuel Lopez<sup>1,2,3</sup>, Flore Vernier<sup>1,2</sup>, Isabelle Grandvillumin<sup>6</sup>, Danièle Evain-Brion<sup>1,2,9</sup>, Philippe Deruelle<sup>4</sup>, Olivier Baud<sup>2,7,10,11</sup>, Christophe Delacourt<sup>2,5,8,9</sup>, Pierre-Henri Jarreau<sup>1,2,3,9</sup>

**1** Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) U767, Paris, France, **2** PremUp, Paris, France, **3** Service de Médecine et Réanimation néonatales de Port-Royal, Groupe hospitalier Cochin, Broca, Hôtel-Dieu, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France, **4** Unité environnement périnatal et croissance, EA4489, Faculté de Médecine, Pôle recherche, IFR 114, Université Lille Nord de France, Lille, France, **5** Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) U955 IMRB Equipe 04, Créteil, France, **6** Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1076, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, Marseille, France, **7** Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) U676, Paris, France, **8** Service de Pneumologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France, **9** Université Paris Descartes, Paris, France, **10** Service de Réanimation et Pédiatrie néonatales, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France, **11** Université Paris Diderot, Paris, France

## Abstract

Intrauterine growth restriction (IUGR) in preterm infants increases the risk of bronchopulmonary dysplasia, characterized by arrested alveolarization. We evaluated the impact of two different rat models (nitric oxide synthase inhibition or protein deprivation) of IUGR on alveolarization, before, during, and at the end of this postnatal process. We studied IUGR rat pups of dams fed either a low protein (LPD) or a normal diet throughout gestation and pups of dams treated by continuous infusion of N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or its diluent on the last four days of gestation. Morphometric parameters, alveolar surface (S<sub>av</sub>), mean linear intercept (MLI) and radial alveolar count (RAC) and transcriptomic analysis were determined with special focus on genes involved in alveolarization. IUGR pups regained normal weight at day 21 in the two treated groups. In the LPD group, S<sub>av</sub>, MLI and RAC were not different from those of controls at day 4, but were significantly decreased at day 21, indicating alveolarization arrest. In the L-NAME group, S<sub>av</sub> and RAC were significantly decreased and MLI was increased at day 4 with complete correction at day 21. In the L-NAME model, several factors involved in alveolarization, VEGF, VEGF-R1 and -R2, MMP14, MMP16, FGFR3 and 4, FGF18 and 7, were significantly decreased at day 4 and/or day 10, while the various factors studied were not modified in the LPD group. These results demonstrate that only maternal protein deprivation leads to sustained impairment of alveolarization in rat pups, whereas L-NAME impairs lung development before alveolarization. Known growth factors involved in lung development do not seem to be involved in LPD-induced alveolarization disorders, raising the question of a possible programming of altered alveolarization.

**Citation:** Zana-Taieb E, Butruille L, Franco-Montoya M-L, Lopez E, Vernier F, et al. (2013) Effect of Two Models of Intrauterine Growth Restriction on Alveolarization in Rat Lungs: Morphometric and Gene Expression Analysis. PLoS ONE 8(11): e78326. doi:10.1371/journal.pone.0078326

**Editor:** William B. Coleman, University of North Carolina School of Medicine, United States of America

**Received:** May 21, 2013; **Accepted:** September 11, 2013; **Published:** November 21, 2013

**Copyright:** © 2013 Zana-Taieb et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work has been supported by a Legs Poix grant of la Chancellerie des Universités de Paris, 2006 and by the Air Liquide Foundation, 2011. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors declare that co-author Prof. Olivier Baud is a PLOS ONE Editorial Board member, which does not alter the authors' adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: elodie.zana-taieb@cch.aphp.fr

## Introduction

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a chronic lung disease affecting preterm infants and characterized by arrested alveolarization in the developmental program. Lungs affected by BPD exhibit fewer and larger alveoli and decreased pulmonary microvascular development [1]. Several recent reports indicate that intrauterine growth restriction (IUGR), defined as failure of the fetus to achieve the expected weight for a given gestational age [2], could contribute to the development of BPD [3]. Most cases of IUGR are due to placental insufficiency, which decreases placental and umbilical blood flow and therefore placental transfer of glucose, essential amino acids and oxygen to the fetus [4]. IUGR is an important health problem, responsible for an increased risk of

morbidity and perinatal mortality [4] and has long-term consequences, such as metabolic syndrome, usually attributed to “fetal programming”. Some studies have also suggested that compromised fetal growth can lead to lung dysfunction during infancy [3,5], childhood [5,6], and adulthood [7,8]. However, the mechanistic basis for a relationship between IUGR and BPD and the possibility of fetal programming of lung development have not been elucidated, as the effects of experimental models of IUGR on lung development depend on the model studied, especially timing, nature of the insult and species [9].

Various models affecting the quality of intrauterine environment and leading to IUGR have been developed, such as low-protein diet (LPD), uterine artery ligation, administration of N-omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, a non-specific

**Table 1.** Weight gain: at P4, P10 and P21 of rat pups in the low protein diet-induced intrauterine growth restriction group and control.

	P4		P10		P21	
	Control	LPD	Control	LPD	Control	LPD
Weight (g)	10.6±1.17	7.6±0.74*	22.3±1.01	17.9±1.64*	47.2±2.15	48.4±2.56

Values are expressed as mean ± SEM.

\*p<0.05 between control and LPD group; two-tailed Mann-Whitney test. n = 16–20 rat pups per group.

doi:10.1371/journal.pone.0078326.t001

**Table 2.** Weight gain: at P4, P10 and P21 of rat pups in L-NAME-induced intrauterine growth restriction group and control.

	P4		P10		P21	
	Control	L-NAME	Control	L-NAME	Control	L-NAME
Weight (g)	10.8±0.47	8.6±0.87*	22.1±1.05	19.6±1.41*	40.9±4.44	45.8±3.9*

The significance for each bar is indicated by \*p<0.05, control vs. L-NAME; two-tailed Mann-Whitney test. Values are expressed as mean ± SEM. n = 5–10 rat pups per group.

doi:10.1371/journal.pone.0078326.t002

NO synthase inhibitor), and gestational hyperoxia or hypoxia [10]. The effects of these models on lung development have not been previously reported. Diaz *et al.* in a model of IUGR induced by L-NAME, suggested that postnatal catch-up growth may completely correct lung development disorders present at birth in IUGR rat pups, [11], whereas Maritz *et al.*, inducing IUGR by umbilico-placental embolization in sheep, showed that structural alterations in the lung induced by IUGR were apparent at 8 weeks and still present 2 years after birth, indicating that IUGR may result in permanent changes [12,13].

To investigate the relationship between IUGR and alveolarization, a key feature of BPD, we studied two models of IUGR in rodents: one induced by maternal protein restriction throughout gestation [10,14] and the other induced by L-NAME from day 17 until the end of gestation [15]. Morphometric analysis was performed on lung tissue from rat pups at three key time-points of alveolar development in the rat, from postnatal day 4 (P4) to P21, a period characterized by a sharp rise in gas exchange surface area [16]. Alveologensis is a highly integrated process that implies cooperative interactions between interstitial, epithelial, and vascular compartments of the lung involving several key control-molecules as various transcription factors, growth factors and matrix-remodeling enzymes [16]. To study the molecular basis of IUGR-induced altered alveolarization in these two models, gene expression analysis for 13 key genes involved in alveolarization and angiogenesis was therefore performed on P10.

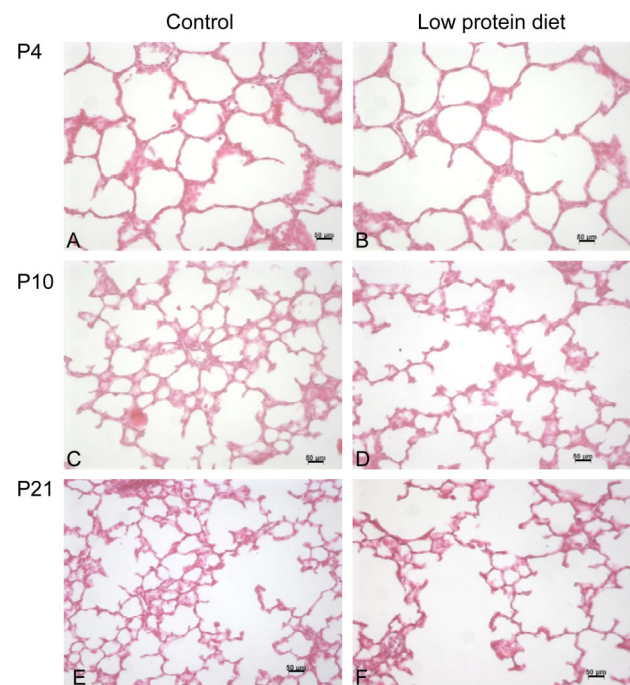
Our results demonstrate that only maternal protein deprivation leads to sustained impairment of alveolarization in rat pups, whereas L-NAME impairs lung development only before alveolarization, with full recovery thereafter at P21. Known factors of lung development do not seem to be involved in IUGR-induced alveolarization disorders in either of the two models.

## Materials and Methods

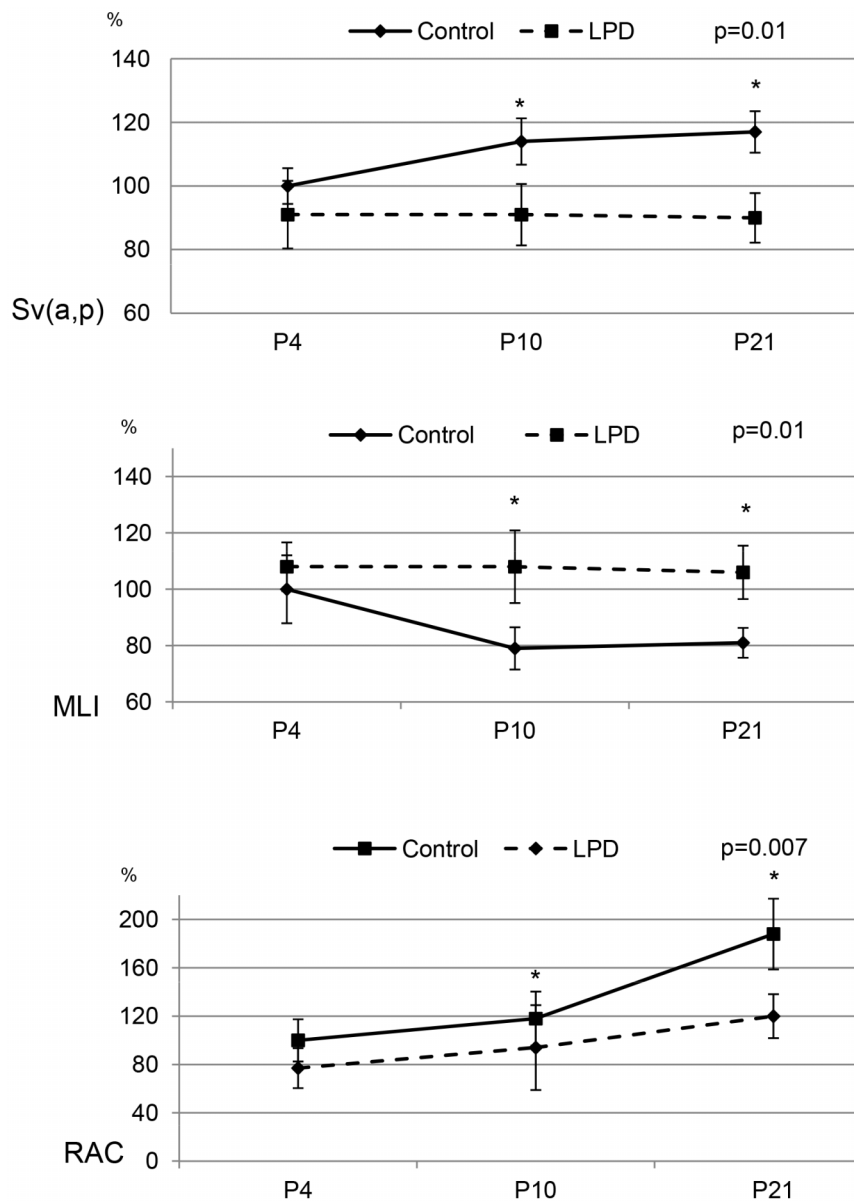
### Animals and diets

All experiments were carried out in compliance with INSERM ethical rules and the recommendations of the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Experiments were designed to minimize the number of animals

needed and the discomfort during experimental procedures. On days 4, 10 and 21, rat pups were killed by an intraperitoneal overdose of pentobarbital sodium (70 µg/g body weight) and then exsanguinated by aortic transection. The "Charles River Laboratories Ethics Committee" (10/17/11 and 07/28/12) approved the low-protein diet protocol. French Ministry of Agriculture animal use accreditation (no. 04860) has been granted to the DHURE laboratory in Lille for experimentation with rats.



**Figure 1.** Light microscopic appearance of the lung in control and low protein diet rat pups at P4 (A and B), P10 (C and D), and P21 (E and F) of postnatal life. Photographs of the alveolar region, taken at the same magnification, are presented for each group. doi:10.1371/journal.pone.0078326.g001



**Figure 2. Morphometric analysis in control and low protein diet rat pups.** Sv(a,p), Mean Linear Intercept (MLI) and Radial alveolar count (RAC) at P4, P10, and P21 were expressed as percentage of mean control value. Significance for each bar is indicated by p values, Control vs. LPD; two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). N=5 animals per group. doi:10.1371/journal.pone.0078326.g002

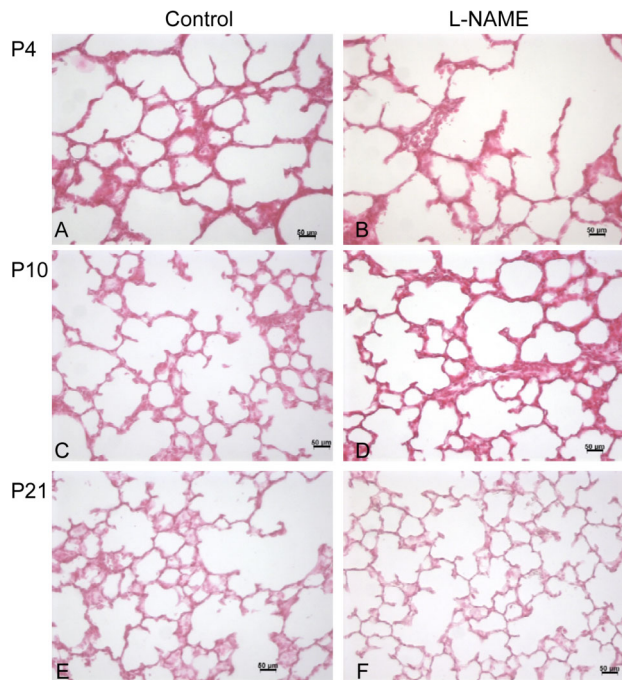
Female Sprague Dawley rats from Charles River (l'Abresle, France) for the LPD model and Janvier (LeGenest St Isle, France) for the L-NAME model were mated with a male. Day 1 of pregnancy (E1) was determined by the presence of spermatozoa in vaginal smears. Pregnant rats were housed individually with free access to food and water under cyclic controlled light. All dams littered spontaneously. Day of birth was defined as P0. At P4, P10 and P21, pups were weighed before being killed and their lungs were harvested for determination of morphometric parameters or were frozen.

**LPD-induced IUGR.** Dams were randomly divided into two groups and fed with different diets from the day of conception until P2. A 22% protein diet was used for the Control group, and an isocaloric 9% protein diet was used for

the LPD group [14]. Caloric deficiency in the LPD group was compensated by carbohydrates. After birth, litters were equalized to 10 pups.

**L-NAME-induced IUGR.** Dams were fed with normal diet and, on day 17 of gestation, randomly assigned to receive L-NAME or saline until the end of gestation. An Alzet osmotic pump (Direct Corp., Palo Alto, CA) was placed subcutaneously on the rat's back after general anesthesia with Isoflurane® and was used to infuse either L-NAME (SIGMA ALDRICH N5751, 98% powder diluted to a final dilution of 50 mg/dL) or saline vehicle. The infusion continued until the end of gestation. To avoid a potential effect of the product delivered via breast milk, equalized litters of 10 pups were adopted on P2 by dams free of any treatment or pump.





**Figure 3. Light microscopic appearance of the lung in control and L-NAME rat pups at P4 (A and B), P10 (C and D), and P21 (E and F) of postnatal life.** Photographs of the alveolar region, taken at the same magnification, are presented for each group. doi:10.1371/journal.pone.0078326.g003

### Lung analysis

**Morphometry.** A cannula adapted to the size of the trachea was selected. The cannula, filled with 4% paraformaldehyde (PFA), was inserted into the trachea and used to inflate the lungs with PFA at a pressure of 20 cmH<sub>2</sub>O. Lungs were then kept inflated by tracheal occlusion and lung volume was evaluated using the fluid displacement method [17]. Lung volume was calculated on the basis of the measured weight increase and the specific gravity of PFA (~1 g/cm<sup>3</sup>). Five animals selected at random from each group were studied at each time-point.

Alveolar surface density (Sv(a,p)) was determined using point counting and mean linear intercept (MLI) methods described by Weibel [18]. Absolute surface area (Sa) per lung was calculated by multiplying surface density by lung volume. Radial alveolar count (RAC) was performed according to Emery's method [19].

**Quantitative real-time PCR.** mRNA expression of genes closely associated with alveolarization i.e. PDGF-A, MMP14 and 16, FGF7 and 18 and their receptors FGFR3 and 4 and angiogenesis i.e. Tie 1 and 2, VEGF and its receptors, VEGFR1 and 2, and adrenomedullin (ADM) were quantified at P4, P10 and P21. Total RNA was extracted from the entire lung tissue using RNeasy Mini RNA extraction kit (Qiagen, Chatsworth, CA). Purified RNA was quantified using NanoDrop<sup>TM</sup> Spectrophotometer technology (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, Delaware). Total RNA was converted into cDNA using 500 ng of total RNA, Superscript III reverse transcriptase, and random hexamer primers (Invitrogen). Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the following protocol: initial denaturation (10 min at 95°C), then a two-step amplification program (15 s at 95°C followed by 1 min at 60°C) repeated 40 times, and finally a dissociation process. Each reaction consisted of a cDNA equivalent of 0.5 µg of total RNA, 12.5 µl SYBR Green PCR Master Mix and forward

and 0.9 or 0.3 mM of reverse primers in a 25 µl reaction volume. Levels of mRNA expression were normalized to a housekeeping gene (18 s mRNA) and expressed as relative value using the  $\Delta\Delta C_t$  method relative to a calibrator sample.

Primers were designed using Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster city, CA). Primer pairs are listed in Table S1.

### Statistical analysis

Multiple group comparisons were performed by Kruskal-Wallis analysis, and two-group comparisons were performed by Mann-Whitney U test using GraphPad Prism software (GraphPad software INC, San Diego, CA). A p value < 0.05 was considered significant.

## Results

### Weight and growth

Body weight was significantly lower in the LPD group compared to the control group on P4 and P10, but not on P21 with total catch-up of growth (Table 1). Body weight was also significantly lower in the L-NAME group (Table 2) on P4 and P10 and was slightly higher than that of the control group on P21.

### Morphometric analysis

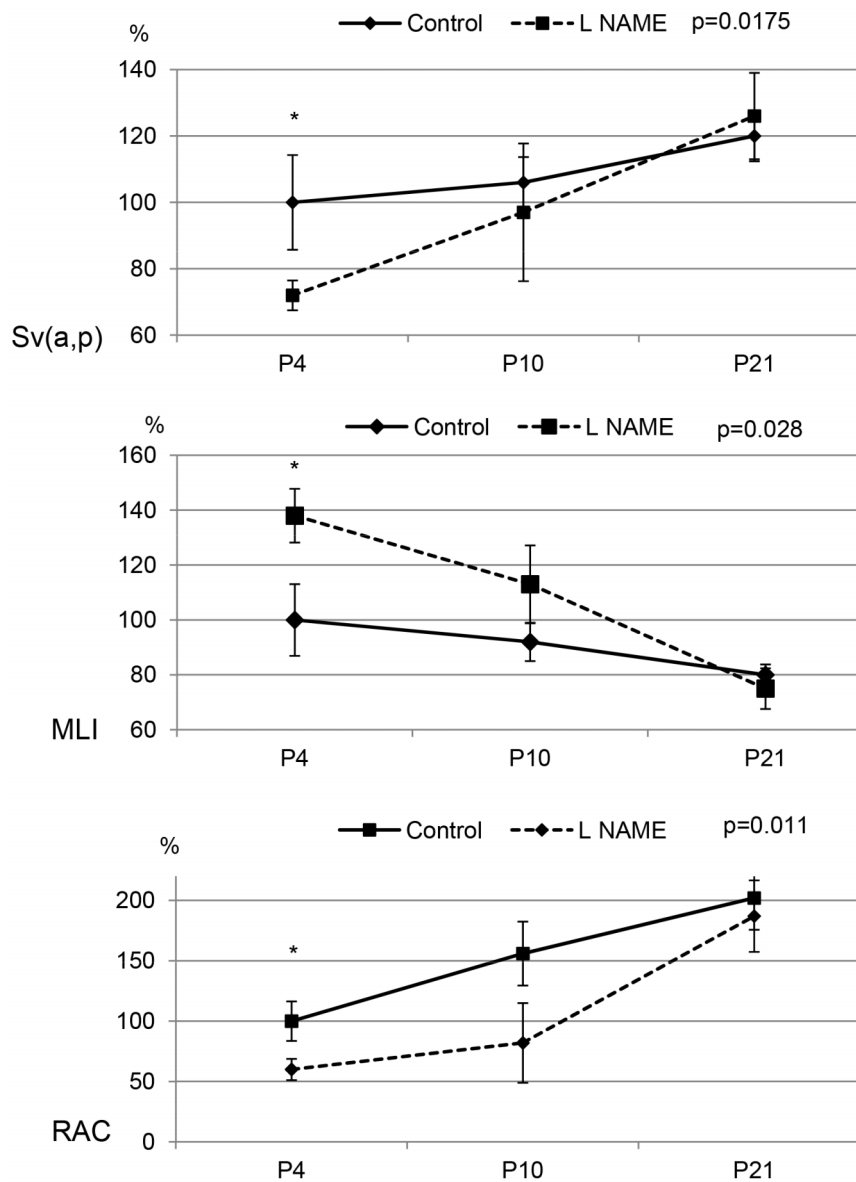
Maternal LPD resulted in significantly decreased alveolarization on P21 (Fig. 1), at the end of the process, resulting in simplified lung structure with enlarged airspaces and fewer secondary septa, whereas no difference was observed on P4 (Fig. 1 and Table S2). Morphometric analysis showed a significant 30% increase of MLI on P10 and P21 and a significant decrease of Sv(a,p) in the same proportions, while no significant difference was observed on P4 in the LPD group compared to controls. On P21, RAC was decreased by 35% in the LPD group (Fig. 2).

Maternal injection of L-NAME resulted in significantly decreased alveolarization on P4, at the beginning of the alveolarization process, but not at P21. Lungs from animals exposed to L-NAME exhibited enlarged alveoli on P4, but not on P10 and P21 (Fig. 3 and Table S3). Mean linear intercept was increased by 60% and Sv(a,p) and RAC was decreased in the same proportion on P4, while no between-group differences were observed thereafter (Fig. 4).

### PCR results

**Gene expression in LPD-induced IUGR.** mRNA levels of factors involved in alveogenesis were assessed on P4, P10 and P21 in rat pups. FGF7, FGF18, FGFR3 and -R4, MMP14 and 16 and PDGF-A expressions were not modified in the LPD group compared to the control group regardless of the time-points considered (Fig. 5). mRNA levels of genes involved in angiogenesis were assessed at the same time-points. In the LPD group, Tie 1 and 2, VEGF and its VEGFR1 and 2 receptors and adrenomedullin gene expressions were not modified regardless of the time-points considered (Fig. 6).

**Gene expression in L-NAME-induced IUGR.** mRNA levels of factors involved in alveogenesis and angiogenesis were assessed on P4, P10 and P21. On P4, MMP14, MMP16, FGFR4 and PDGF expressions were significantly decreased in the L-NAME group compared to the control group. Fibroblast growth factor 7, FGF18, FGF-R3 and -R4 and MMP14 expressions were significantly decreased in the L-NAME group compared to the control group on P10. Matrix metalloprotease 14, MMP16 and FGFR3 expressions were significantly increased on P21 in the L-NAME group compared to the control group (Fig. 7). Expression of VEGF, a gene involved in angiogenesis, was significantly



**Figure 4. Morphometric analysis in control and L-NAME rat pups.** Sv(a,p), Mean Linear Intercept (MLI) and Radial alveolar count (RAC) in control and L-NAME rat pups at P4, P10, and P21 were expressed as percentage of mean control value. The significance for each time-point is indicated by p values, control vs. L-NAME; two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).  $n = 5$  animals per group.  
doi:10.1371/journal.pone.0078326.g004

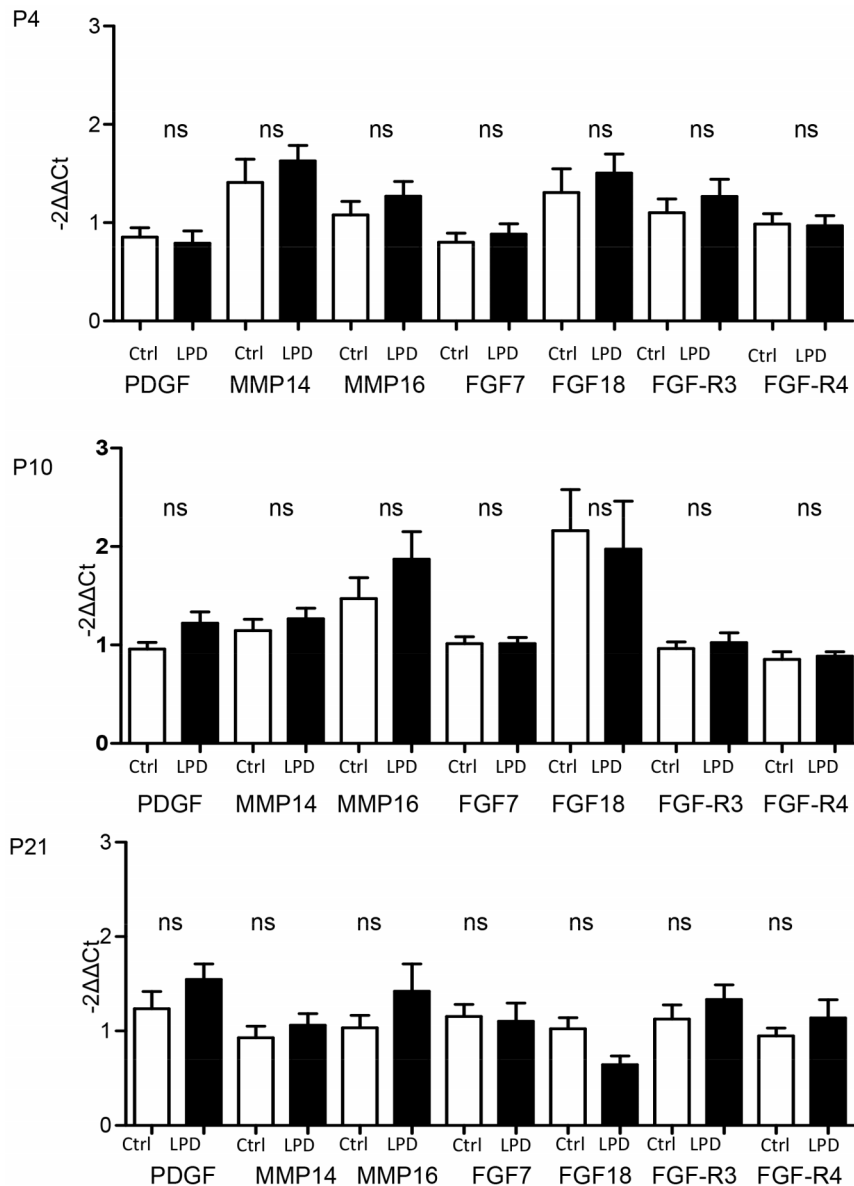
decreased in the L-NAME group compared to the control group on P4 and P10 (Fig. 8). Moreover, on P4, the expression of VEGF receptors, VEGF-R1 and -R2 was significantly decreased in the L-NAME group. On P21, adrenomedullin expression was significantly increased in the L-NAME group compared to the control group.

## Discussion

This study, comprising complete structural analysis of lung tissue from rat pups at three key time-points of the alveolarization process, from the start of alveolarization on day 4, to the end of alveolarization on day 21 [16,20], demonstrated that LPD-induced IUGR in rats induced arrested alveolarization similar to that observed in BPD. In this model, alveolarization was normal at the beginning of the alveolarization process, but became

progressively impaired and markedly decreased at the end of the process. To our knowledge, this is the first study in rodents showing progressive impairment of alveolarization induced by conditions leading to IUGR. In contrast, the L-NAME model appears to be inappropriate to study long-term consequences of IUGR for lung development, as alveolarization was impaired at P4 but subsequently returned to normal by P21. This study also demonstrates major differences between the two IUGR models in terms of the expression of key genes known to be involved in alveolarization and lung angiogenesis.

In the L-NAME model, morphometric analysis revealed significant differences in alveolarization at the beginning of the alveolarization process, on P4, with correction on P21. These results are similar to previously published results in this model showing decreased alveolarization on P0 with a catch-up on P7 and P14 [11]. Although a different method was used to deliver L-



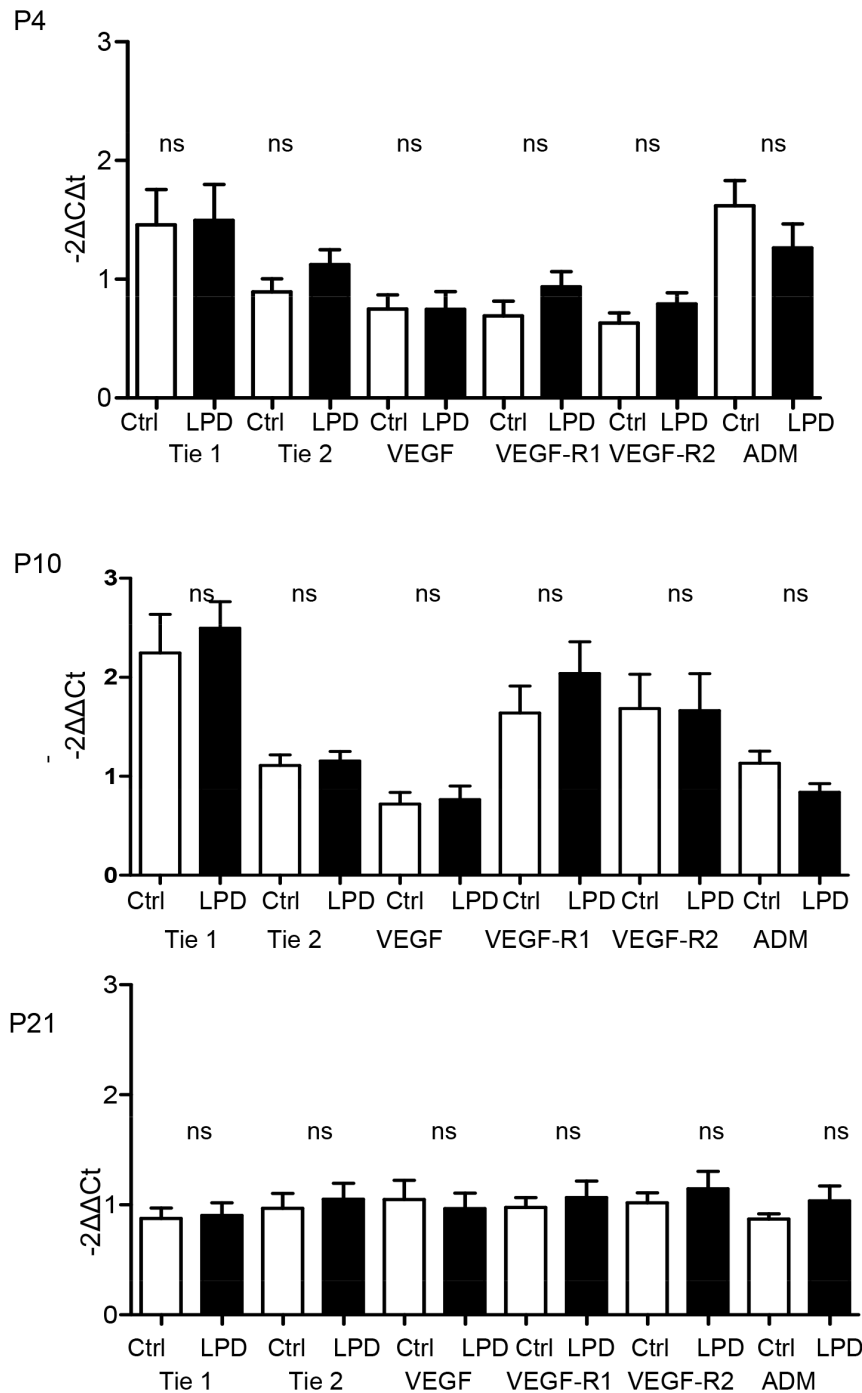
**Figure 5. Effect of low protein diet-induced IUGR on mRNA expression of factors involved in alveolarization at day 4, 10 and 21.** Expression of PDGF, MMP14 and 16, FGF7 and 18 and their receptors FGFR3 and 4 in neonatal rat lungs.  $n=9-10$  per group. mRNA expression was assessed by real-time PCR. The significance for each bar is indicated by \*:  $p<0.05$ . Control vs. LPD; two-tailed Mann-Whitney test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0078326.g005

NAME in our study [11], daily gavage versus subcutaneous pump, our study confirms that, in parallel to postnatal catch-up growth, lung development disorders present at birth in IUGR pups may be completely corrected in this model. The L-NAME model therefore appears to be inappropriate to evaluate the consequences of IUGR on alveolarization. A reversible effect of L-NAME model has been previously demonstrated: L-NAME infusion from embryonic day (E) 14 to E18 of gestation resulted in normal fetal and placental growth on E21. However, Neerhof showed that perfusion of L-NAME from day 14 to 18 of gestation only resulted in normal fetal and placental growth on P21, suggesting a reversible phenomenon [21]. Recent studies have also failed to demonstrate any long-term metabolic consequences in this model [15], questioning the value of this model to study the medium-term and long-term consequences of IUGR.

The experimental settings of the two models used in this study clearly varied in terms of the exposure window (last 4 days of gestation *vs.* throughout gestation) and the pathophysiological cause of low birth weight (Nitric Oxide synthase inhibition *vs.* malnutrition). L-NAME treatment administered at E17 to induce IUGR in rodents was first described 20 years ago [22]. Trials of earlier administration of L-NAME: from day 1 to day 18, resulted in a decreased number of implantation sites, decreased litter and placenta weights and an increased number of maternal deaths [23]. When administered at E12, L-NAME induced fetal resorptions and hind limb necrosis, which were not observed when it was administered after E15 [24]. Consequently, administration of L-NAME throughout gestation induces effects other than IUGR and, in order to induce IUGR, L-NAME treatment is therefore classically started in the last third of gestation. Although



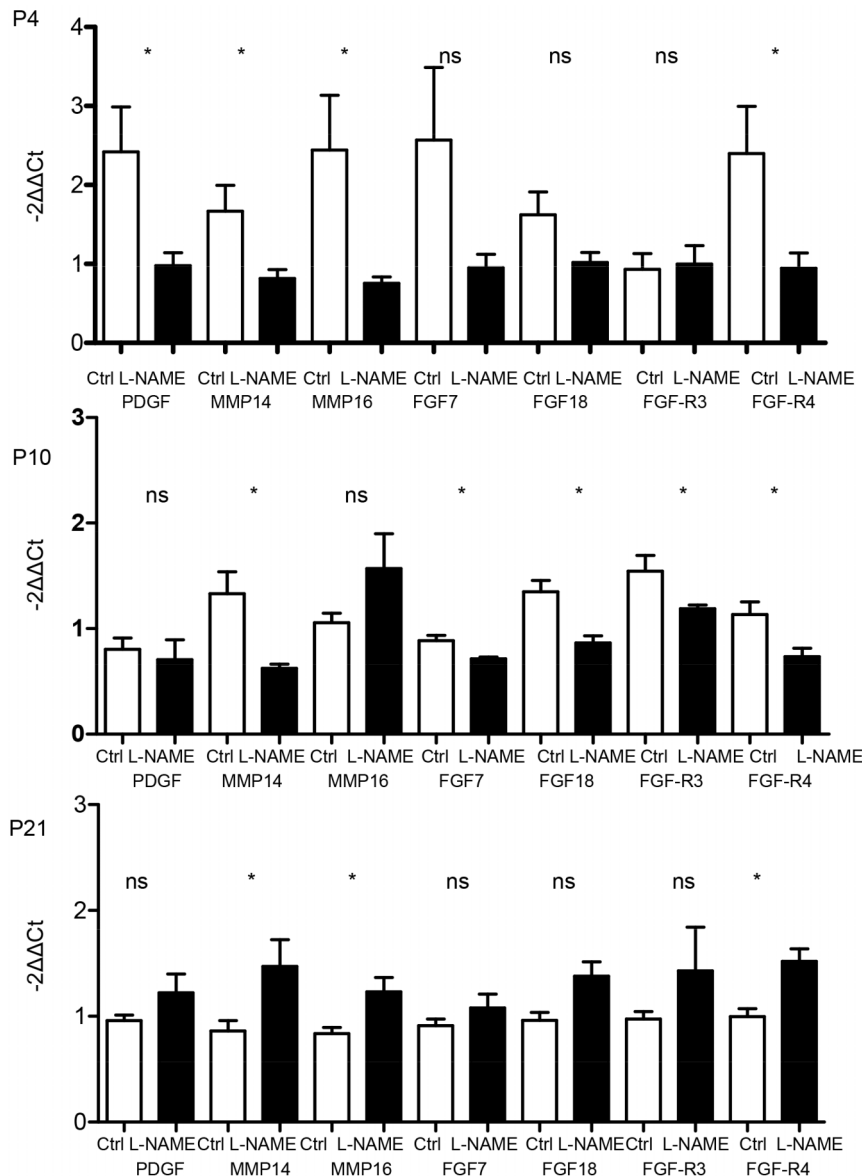


**Figure 6. Effect of low protein diet-induced IUGR on mRNA expression of factors involved in angiogenesis at day 4, 10 and 21.** Expression of Tie 1 and 2, VEGF and its two receptors (VEGF-R1 and 2) and ADM at P10 in neonatal rat lungs.  $n=9-10$  per group. mRNA expression was assessed by real-time PCR. The significance for each bar is indicated by \*:  $p<0.05$ . Control vs. LPD; two-tailed Mann-Whitney test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM. doi:10.1371/journal.pone.0078326.g006

exposure time to each treatment could explain partly the differences observed between the 2 models, this study design nevertheless allows comparison of the pulmonary consequences of IUGR in pups of similar weights at P4.

Several reports suggest that LPD-induced IUGR is responsible for long-term metabolic consequences that are not reversible, even in adulthood: low muscle mass [25], adult-onset glucose intolerance [26], adult hypertension [27], and early aging [28]. In our

study, in the LPD-induced IUGR model, all parameters quantifying alveolarization on P4 were equal to those observed in the control group, but indicated decreased alveolarization in the LPD group at P21: MLI, which is inversely correlated with alveolarization, was equal in the 2 groups at P4 and increased in the LPD group at P21; Sv(a,p) was identical at P4, but significantly decreased at P21 in the LPD group; RAC exhibited the same pattern and was also decreased at P21. Notably, LPD group pups



**Figure 7. Effect of L-NAME-induced IUGR on mRNA expression of factors involved in alveolarization at day 4, 10 and 21.** Expression of PDGF, MMP14 and 16, FGF7 and 18 and their receptors FGF-R3 and 4 in neonatal rat lungs.  $n=4-5$  rat pups per group. mRNA expression was assessed by real-time PCR. The significance for each bar is indicated by \*:  $p<0.05$ , control vs. L-NAME; two-tailed Mann-Whitney test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

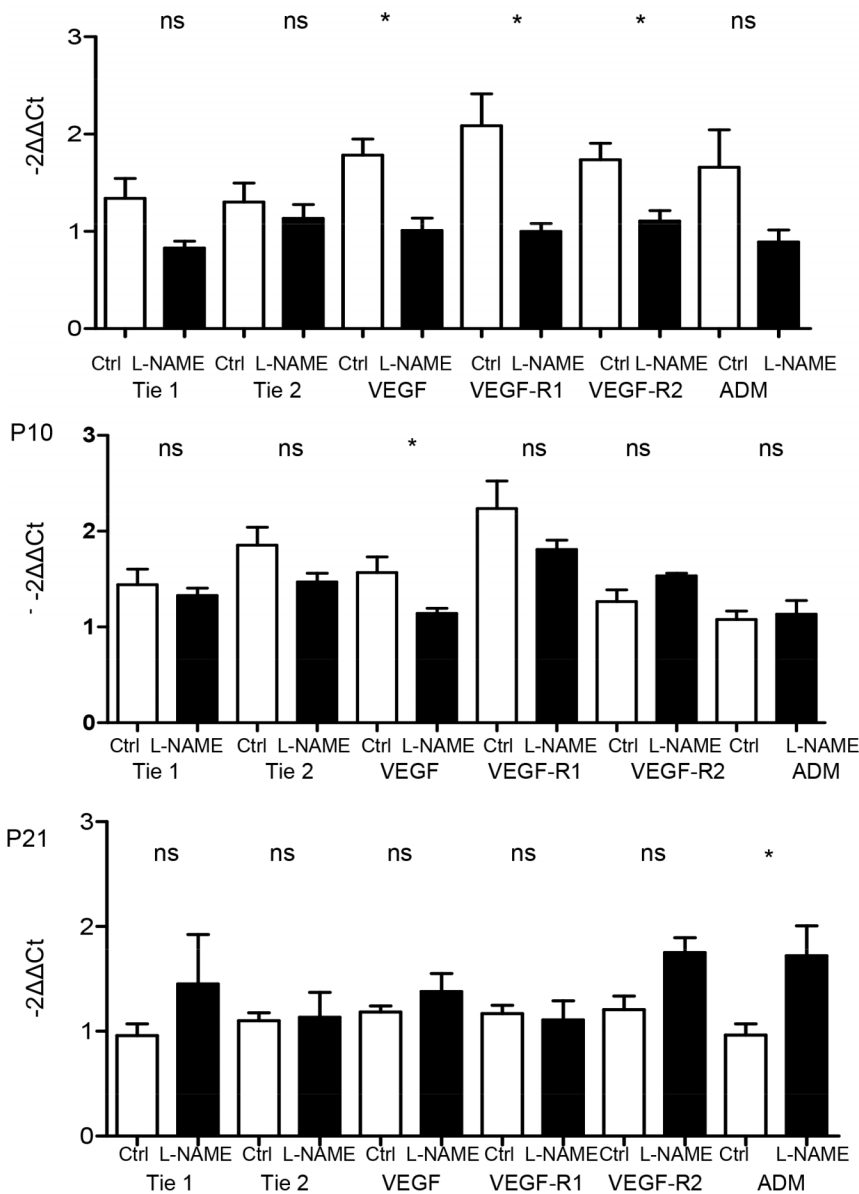
doi:10.1371/journal.pone.0078326.g007

regained normal weight at P21 and morphometric parameters can therefore be interpreted as reflecting a real reduction of alveolarization, independently of weight gain. In a previous study, we observed that morphometric parameters were closely correlated with body weight and differences between groups may be difficult to interpret when body weights are different [29]. These results suggest an arrest or at least a marked impairment of alveolar development. Consequently, this experimental model can be considered to very closely fit the characteristics of BPD, correlated with arrested alveolarization [1]. These results appear to be discordant with those previously published in a different rat strain with slightly different maternal diets, *eg* lower protein intake in LDP and in controls [30]. These authors did not observe any impaired alveolar development on P70, but based on a less complete morphometric analysis than that conducted in our study

and, more surprisingly, increased alveolarization in the LDP group at P70.

Our study also investigated whether the gene expression of factors involved in alveolar and vascular development was affected by IUGR. Factors involved in alveolarization have been studied by three main approaches: 1) alveolarization study when these factors were not expressed in KO models [31] or by specific inhibition [32]; 2) expression of these factors during normal alveolarization [33]; 3) changes in the expression of these factors in models of postnatal insult leading to alveolarization disorders such as hyperoxia or mechanical ventilation [32]. In some cases, attempts to correct induced alveolarization disorders by administration of these factors were investigated, but with only partial success except for VEGF therapy [34]. Alveologenesis is a process coordinated by multiple interactions involving paracrine mechanisms between

P4



**Figure 8. Effect of L-NAME-induced IUGR on mRNA expression of factors involved in angiogenesis at day 4, 10 and 21.** Expression of Tie 1 and 2, VEGF and its two receptors (VEGFR1 and 2) and ADM in neonatal rat lungs.  $n = 4-5$  rat pups per group. mRNA expression was assessed by real-time PCR. The significance for each bar is indicated by \*:  $p < 0.05$ , control vs. L-NAME; two-tailed Mann-Whitney test. Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0078326.g008

lung fibroblastic, epithelial, microvascular and extracellular matrix (ECM) components [16]. The factors studied here have been extensively described in this process. The role of antenatal events in the pathogenesis of alveolarization disorders has been well documented, especially in antenatal inflammation models [35]. However, alterations of factors involved in alveolarization have been less extensively studied in models and the results are fairly discordant. Intra-amniotic injection of group B streptococcus in macaques induced abnormal alveolar development with altered expressions of MMP2 and angiopoietin only [36]. Overall, the results are fairly discordant, as factors and their modifications vary from one model to another, highlighting the complexity of

processes in which each factor is involved at a precise timing with precise interactions with other factors.

In the L-NAME model, factors previously shown to be involved in alveolarization, MMP14, FGFR3 and 4, FGF18 and 7, were significantly decreased on P4 and/or P10, but this decrease was not associated with impaired alveolarization at P10. Interestingly, L-NAME, given from E10 to E20 in pregnant Sprague-Dawley rats via an osmotic pump, decreased MMP14 expression in the uterine vessel wall on E20 [37]. Whether this effect on MMP14 is also observed in the fetus and during the first days of life has yet to be studied. Surprisingly, MMP14 expression was significantly increased in the L-NAME group on P21, at a time when the

alveolarization process is theoretically completed and the decreased alveolarization observed at P4 has been corrected much earlier as observed in our study at P10 and in other studies at P7 [11]. Similar surprising results were observed for VEGF expression. VEGF increased during alveolarization, and decreased when alveolarization was impaired. VEGF inhibition decreased alveolarization and VEGF administration restored alveolarization, even after the end of the alveolarization process [34]. In our study, antenatal L-NAME treatment induced a sustained decrease of VEGF and its receptor expressions (P4 and/or P10) during the alveolarization process and in the period during which alveolarization can be assumed to have been restored in this model. Finally, none of the factors usually described as essential for alveolarization were modified in the LPD model. These results raise the following question: when the alveolarization process is impaired antenatally, does it respond to regulation factors other than those involved in the normal process and in postnatal models of impaired alveolarization in rat pups?

It has now been clearly established that the developing fetus perceives the environment during specific windows of sensitivity and optimizes future metabolic responses by reprogramming its genome. This reprogramming promotes early survival and reproductive success, but potentially causes a predisposition to disease in later life [10], that only develops when an additional stress occurs subsequently (preterm birth, obesity or high-fat diet). The hypothesis of the fetal or “early” origin of adult disease was originally proposed by Barker, who stated that environmental factors, particularly nutrition, act in early life to program risks for metabolic syndrome, hypertension, insulin resistance and obesity. Lung consequences of IUGR have now also been clearly demonstrated with an increased incidence of BPD [3] and long-term impairment of lung function [8]. Our results suggest that a compromised intrauterine environment could disrupt normal fetal lung development by pathways other than those described in classical models of altered alveolarization. When a modification of programming occurs, involvement of growth factors is inconstant as demonstrated for other organs in IUGR models. Microarray analysis in LPD-induced IUGR in rat showed that only 5 of the 54 crucial factors for kidney development were significantly modified [14]. Proteomic studies in IUGR piglets have shown that, in addition to a significant reduction in small intestine, liver and

skeletal muscle masses, IUGR was also associated with an alteration of proteins known to regulate cellular signalling and intermediary metabolism, resulting in increased proteolysis and reduced polypeptide synthesis [38]. However, the consequences on lung development specifically related to intrauterine growth restriction need to be more thoroughly investigated.

In conclusion, our results demonstrate that two models of IUGR, L-NAME and LPD, have very different impacts on lung development and gene expression patterns of key factors involved in lung development. Only the LPD model closely fits with IUGR-induced alveolarization disorder. The absence of involvement of key factors of alveolarization despite abnormal lung development raises the issue of the role of other regulators. Morbidity induced by IUGR should be analyzed in terms of its pathophysiological cause rather than low birth weight *per se* and LPD-induced IUGR may therefore constitute a useful tool for an experimental approach to IUGR-induced BPD.

## Supporting Information

**Table S1 PCR primers for quantitative real-time PCR.** (DOC)

**Table S2 Morphometric analysis of the lung of control and low protein diet-induced intrauterine growth restriction groups.** Significance for each time-point is indicated by symbols; two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$  animals per group. (DOC)

**Table S3 Morphometric analysis of the lung of control and L-NAME- induced intrauterine growth restriction groups.** Significance for each time-point is indicated by symbols; two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.  $n = 5$  animals per group. (DOC)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EZT EL CD PHJ DEB. Performed the experiments: EZT MLF LB FV IG. Analyzed the data: EZT EL CD PHJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: EZT PHJ. Wrote the paper: EZT EL PD CD OB PHJ.

## References

- Jobe AH, Bancalari E (2001) Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723–1729.
- Halliday HL (2009) Neonatal management and long-term sequelae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 23: 871–880.
- Zeitlin J, El Ayoubi M, Jarreau PH, Draper ES, Blondel B, et al. (2010) Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *J Pediatr* 157: 733–739 e731.
- Rosenberg A (2008) The IUGR newborn. *Semin Perinatol* 32: 219–224.
- Greenough A, Yuksel B, Cheeseman P (2004) Effect of in utero growth retardation on lung function at follow-up of prematurely born infants. *Eur Respir J* 24: 731–733.
- Doyle LW (2006) Respiratory function at age 8–9 years in extremely low birthweight/very preterm children born in Victoria in 1991–1992. *Pediatr Pulmonol* 41: 570–576.
- Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, et al. (1991) Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *Br J Med* 303: 671–675.
- Edwards CA, Osman LM, Godden DJ, Campbell DM, Douglas JG (2003) Relationship between birth weight and adult lung function: controlling for maternal factors. *Thorax* 58: 1061–1065.
- Briana DD, Malamitsi-Puchner A (2012) Small for gestational age birth weight: impact on lung structure and function. *Paediatr Respir Rev*.
- McMillen IC, Robinson JS (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571–633.
- Diaz V, Lebras-Isabet MN, Denjean A (2005) Effect of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced intrauterine growth restriction on postnatal lung growth in rats. *Pediatr Res* 58: 557–561.
- Maritz GS, Cock ML, Louey S, Joyce BJ, Albuquerque CA, et al. (2001) Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis. *Pediatr Pulmonol* 32: 201–210.
- Maritz GS, Cock ML, Louey S, Suzuki K, Harding R (2004) Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep. *Pediatr Res* 55: 287–295.
- Buffat C, Boubred F, Mondon F, Chelbi ST, Feuerstein JM, et al. (2007) Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes. *Endocrinology* 148: 5549–5557.
- Butruille L, Mayeur S, Moitrot E, Storme L, Knauf C, et al. (2013) Maternal hypertension induced by NO blockade does not program adult metabolic diseases in growth-restricted rat fetuses. *Metabolism*.
- Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C (2005) Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res* 57: 38R–46R.
- Franco ML, Waszak P, Banalec G, Levame M, Lafuma C, et al. (2002) LPS-induced lung injury in neonatal rats: changes in gelatinase activities and consequences on lung growth. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L491–500.
- Weibel ER (1966) [Morphometric studies on the growth of gas exchange capacity of the rat lung]. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 24: C56–59.
- Emery JL, Mithal A (1960) The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood. *Arch Dis Child* 35: 544–547.
- Burri PH, Dbaly J, Weibel ER (1974) The postnatal growth of the rat lung. I. Morphometry. *Anat Rec* 178: 711–730.

21. Neerhof MG, Synowiec S, Khan S, Thaete LG (2011) Pathophysiology of chronic nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction in the rat. *Hypertens Pregnancy* 30: 28–36.
22. Yallampalli C, Garfield RE (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 169: 1316–1320.
23. Fernandez Celadilla L, Carbajo Rueda M, Munoz Rodriguez M (2005) Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats: effects on blood pressure, fetal growth and litter size. *Arch Gynecol Obstet* 271: 243–248.
24. Tiboni GM, Giampietro F, Di Giulio C (2003) The nitric oxide synthesis inhibitor Nomega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes limb defects in mouse fetuses: protective effect of acute hyperoxia. *Pediatr Res* 54: 69–76.
25. Toscano AE, Manhaes-de-Castro R, Canon F (2008) Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition* 24: 270–278.
26. Ozanne SE (1999) Programming of hepatic and peripheral tissue insulin sensitivity by maternal protein restriction. *Biochem Soc Trans* 27: 94–97.
27. Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN (1997) Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clin Sci (Lond)* 93: 147–152.
28. Martin-Gronert MS, Tarry-Adkins JL, Cripps RL, Chen JH, Ozanne SE (2008) Maternal protein restriction leads to early life alterations in the expression of key molecules involved in the aging process in rat offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R494–500.
29. Mehats C, Franco-Montoya ML, Boucherat O, Lopez E, Schmitz T, et al. (2008) Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on alveolarization and hyperoxia toxicity in newborn rats. *PLoS One* 3: e3445.
30. Alejandre Alcazar MA, Morty RE, Lendzian L, Vohlen C, Oestreicher I, et al. (2011) Inhibition of TGF-beta signaling and decreased apoptosis in IUGR-associated lung disease in rats. *PLoS One* 6: e26371.
31. Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX (1998) FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 125: 3615–3623.
32. Vadivel A, Abozaid S, van Haften T, Sawicka M, Eaton F, et al. (2010) Adrenomedullin promotes lung angiogenesis, alveolar development, and repair. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 152–160.
33. Franco-Montoya ML, Boucherat O, Thibault C, Chailley-Heu B, Incitti R, et al. (2011) Profiling target genes of FGF18 in the postnatal mouse lung: possible relevance for alveolar development. *Physiol Genomics* 43: 1226–1240.
34. Thebaud B, Ladha F, Michelakis ED, Sawicka M, Thurston G, et al. (2005) Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 112: 2477–2486.
35. Thomas W, Speer CP (2011) Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? *Neonatology* 99: 177–187.
36. McAdams RM, Vanderhoeven J, Beyer RP, Bammler TK, Farin FM, et al. (2012) Choriondecidual infection downregulates angiogenesis and morphogenesis pathways in fetal lungs from macaca nemestrina. *PLoS One* 7: e46863.
37. Hale SA, Weger L, Mandala M, Osol G (2011) Reduced NO signaling during pregnancy attenuates outward uterine artery remodeling by altering MMP expression and collagen and elastin deposition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H1266–1275.
38. Wang J, Chen L, Li D, Yin Y, Wang X, et al. (2008) Intrauterine growth restriction affects the proteomes of the small intestine, liver, and skeletal muscle in newborn pigs. *J Nutr* 138: 60–66.

Conclusion : Seul le RCIU induit par restriction protidique induit des troubles de l'alvéolisation durables. Ce modèle peut être choisi pour la suite des investigations des anomalies de l'alvéolisation induit par un RCIU. Mais, les gènes connus pour être impliqués dans l'alvéolisation ne sont pas modifiés dans le seul modèle de troubles de l'alvéolisation durable, posant la question d'une programmation anténatale de ces anomalies et nécessitant des explorations complémentaires.

Pour le modèle L-NAME, nous confirmons les données précédemment obtenues par l'équipe de V Diaz montrant que les descendants de mère ayant reçu du L-NAME *per os* en fin de gestation ont des troubles de l'alvéolisation précoces, qui se corrigent dans la première semaine de vie (Diaz, Lebras-Isabet et al. 2005). Même si ce modèle ne permet pas de reproduire de troubles de l'alvéolisation, il pose la question des mécanismes de réparation mis en jeu.

**Tableaux supplémentaires*****Table S 1: PCR primers for quantitative real-time PCR***

Name	NCBI reference sequence	Forward	Reverse
FGF7	NM_022182	CTGTGGCAGTTGGAATTGTG	TCATTGCATTCTTTCTTTGCAT
FGF18	NM_019199	CCTGCACTTGCCTGTGTTTA	CCGAGTCTGGTTCTCCACAT
FGFR3	NM_053429	AACA-GATGCTCCGTCCTCAG	AGCGGAAGCGTACAGTGT
FGFR4	NM_001109904	GGAT-GACTCCTTACCCTCCA	GGTGTGTCCAGTAAGGTGCTT
MMP14	NM_031056	TACC-TACCTCCAGGGGACCT	GCCTCATAGCCTTCATCGTG
MMP16	NM_080776	GAGCTGGGACATGCTCTAGG	GAGG-GATCTTGTCAGGTGGA
Tie 1	NM_053545	AAGGTCACACACACGGTGAA	TGGTGGCTGTACATTTTGA
Tie 2	NM_001105737	AGAAGTGCATCTGCCTCACG	TTCACATCTCCGGACAATCA
PDGF-A	NM_012801	ATGCCTTGGAGACAAACCTG	GGGAATGGCTTCCTCAATACT
ADM	NM_012715	GGGCTCGTTGATGAGAAGAC	GGGCTGTGCTCTGAGTGCT
VEGF-A	NM_031836	CGTCTACCAGCGCAGCTATTG	CACACAGGACGGCTTGAAGAT
VEGF-R2	NM_013062	TTGGCAAATACAACCCTTCAGAT	CACTCAGTCACCAACACCCTTTC
VEGFR-1	NM_005111	AGCGCATGATGGTCA-TAGAA	TTGGCACATCTGTGACGTAAA

**Table S 2: Morphometric analysis of the lung of control and low protein diet-induced intrauterine growth restriction groups.**

Day	P4 (n=5)		P10 (n=5)		P21 (n=5)	
Group	Control	LPD	Control	LPD	Control	LPD
Alveolar surface area						
Sv(a,p) (cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )	96.27±12.28	88.29±8.00	110.01±10.07	88.17±10.82 §	112.79±9.28	86.67±9.4 ¥
Sa (cm <sup>2</sup> )	56.04±10.27	34.162±4.94 *	121.24±26.15	64.46±14.8 §	197.38±33.77	141.75±23.68 ¥
Alveolar parenchyma						
Vvp (%)	0.91±0.04	0.91 ±0.02	0.93±0.02	0.91 ±0.002	0.95±0.012	0.94±0.017
Mean Liner Intercept						
MLI (cm)	0.04±0.006	0.05±0.006	0.039±0.004	0.05±0.007 §	0.037±0.003	0.05±0.005 ¥
Radial alveolar count						
n=	4.66±0.92	3.63±0.96	5.5±1.38	4.4±2.08 §	8.78±1.7	4.66±0.94 ¥

\* Significantly different at P4 between low protein diet (LPD) and control groups (p≤0.05)

§ Significantly different at P10 between LPD and control groups (p≤0.05)

¥ Significantly different at P21 between LPD and control groups (p≤0.05)

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test

Abbreviations: n=number; Sv(a,p), alveolar surface density; Vvp, volumetric density of lung alveolar parenchyma; MLI, mean linear intercept; Sa, absolute surface area of airspaces.



**Table S 3: Morphometric analysis of the lung of control and L-NAME- induced intrauterine growth restriction groups.**

Day	P4 (n=5)		P10 (n=5)		P21 (n=5)	
Group	Control	L-NAME	Control	L-NAME	Control	L-NAME
Alveolar surface area						
Sv(a,p) (cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )	80.6±15.3	58.62±5.31 *	85.58±8.78	78.35±21.24	96.97±7.05	102.08±13.75
Sa (cm <sup>2</sup> )	52.35±9.53	28.43±5.44*	109.16±5.57	67.06±24.52 §	163.18±41.58	216.8±16.89
Alveolar parenchyma						
Vvp (%)	0.92±0.017	0.9 ±0.002	0.92±0.021	0.85 ±0.114	0.92±0.03	0.95 ±0.018
Mean Liner Intercept						
MLI (cm)	0.06±0.009	0.08±0.007 *	0.05±0.005	0.06±0.01	0.04±0.003	0.04±0.005
Radial alveolar count						
n=	4.4±1.02	2.7±0.58 *	7.01±1.44	4.57±1.38 §	9.08±1.5	8.38±1.84

\* Significantly different at P4 between Control and L-NAME group (p≤0.05)

§ Significantly different at P10 between Control and L-NAME group (p≤0.05)

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney test

Abbreviations: n=number; Sv(a,p) alveolar surface density; Vvp, volumetric density of lung alveolar parenchyma; MLI, mean linear intercept; Sa, absolute surface area of airspaces

## **Article 2**

**Alveolarization impairment induced by  
intrauterine growth restriction in rats: a  
postnatal genome wide analysis.**

En préparation

## Résumé

---

Dans ce deuxième article nous avons voulu progresser dans la compréhension de la physiopathologie des anomalies du développement alvéolaire induits par un RCIU en explorant par une méthode peu utilisée encore à ce jour dans le développement pulmonaire les poumons d'animaux ayant subi en période anténatale une restriction protidique en les comparant à des témoins.

Nous avons donc utilisé la méthode des puces d'expression à ARNm dans le laboratoire de D Vaiman (INSERM UMR\_S1016-UMR8104. Génétique, Epigénétique et Physiopathologie de la Reproduction). Les ARNm ont été extraits des poumons totaux et poolés en deux groupes de 2 ou 3 individus RCIU et contrôles. Au total 12 lames ont été analysées correspondant à 2 groupes d'animaux RCIU et 2 groupes de contrôles, aux trois temps, P4, P10 et P21. Les données ont été confirmées par qPCR.

L'analyse des données des puces a été réalisée grâce aux logiciels DAVID et KEGG. Les résultats sont totalement novateurs. Trois voies sont modifiées aux trois temps : la voie des molécules d'adhésion, la voie de molécules de l'immunité et celle des « peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) », famille de récepteurs nucléaires.

Nous avons recherché l'existence de modifications au niveau chromosomique en regardant si l'expression de groupes de gènes situés à proximité les uns des autres étaient massivement dérégulée. Nous avons également réalisé une analyse des promoteurs.

Nous avons choisi d'explorer plus en profondeur la voie PPAR, en réalisant une analyse au niveau protéique par méthode quantitative en Western Blot. Nous avons regardé également l'impact à long terme des modifications de cette voie en analysant le poumon à la fin de l'alvéolisation en immunohistochimie en étudiant les deux versants clés du développement alvéolaire pulmonaire à savoir la septation elle-même en étudiant l'élastine et la vascularisation avec la quantification des vaisseaux. De façon intéressante, le nombre de gènes dont l'expression est dérégulée augmente avec le temps témoin de modifications en cascade.

En conclusion, cette étude est novatrice tant par la technique utilisée que par les résultats obtenus. Des agonistes et des antagonistes des PPAR à la fois  $\alpha$  et  $\gamma$  sont disponibles sur le marché et pourraient être testés dans ce modèle pour étudier leur effet aggravant ou protecteur sur le poumon à très court terme.

## Introduction

Bronchopulmonary dysplasia is the main respiratory sequelae of preterm birth and results in increased healthcare cost, prolonged hospital stay with frequent readmissions and deleterious effects on subsequent growth and neurodevelopment. Bronchopulmonary dysplasia is a multifactorial disease and results from multiples hits beginning in antenatal period with chorioamnionitis for example and pursuing after birth with various triggering events as mechanical ventilation, oxygen, sepsis and patent ductus arteriosus (17). Recently, intrauterine growth restriction, with his multiple etiologies, has emerged as a risk factor for BPD. The risk of suffering of BPD is multiplied by 6 in case of IUGR (36).

Intrauterine growth restriction is a major health care problem as environmental constraint before birth is associated with increased risk of the metabolic syndrome in later life (3, 15).

Many animal models had been developed to study the consequences of this antenatal insult (21). Results of previous studies on alveolar consequences of IUGR are quite inhomogeneous, depending on animal itself, model of inducing IUGR and timing of insult. Maritz and al. induced in sheep, persistent alveorization disorder with a model using implanted catheter in the descending aorta (18, 19). In a model of NO synthase inhibition alveolarization disorders are spontaneously reversible (11). Among these models, protein restriction throughout gestation mimics the long term metabolic consequences of human IUGR as diabetes and hypertension. We have previously shown that this model is relevant to study alveolar disorder induced by IUGR but we failed to demonstrate the involvement of known factors of alveolarization or angiogenesis. Transcriptomic study in the protein restriction model reveals massive deregulation of genome in rat pups lung at E21 (33).

Therefore, we performed a genome wide analysis with micro array at three key time points of lung development, before (D4), during (D10) and immediately after the alveolarization process (D21) in rat pups lung in a model of low protein diet-induced IUGR.

## **Materials and methods**

### ***Animals and diets***

All experiments were carried out in compliance with the ethical rules of our institution (National Institute for Health and Medical Research, INSERM) and with the recommendations of the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Female Sprague Dawley rats from Charles River (l'Abresle, France) were mated with a male rat. Gestation day 1 of pregnancy was determined by the presence of spermatozoa in a vaginal smear. The animals were housed with free access to food and water under controlled light (12-h light, 12-h dark cycle). All dams in both groups littered spontaneously. Pregnant rats were housed individually throughout gestation and fed with different diets since the day of conception until postpartum day 2. Dams were randomly divided into two groups according to protein diet: a 23% protein diet (NPD), or an isocaloric 9% protein diet, (LPD) as previously described (4). Caloric deficiency in the LPD was compensated by addition of carbohydrates. The day of birth was defined as postnatal day 0. On post-partum day 2, litters were equalized to 10 pups to avoid influence of number of pups per dam on postnatal growth. All pups were weighed on sacrificed day (4, 10 and 21<sup>th</sup>). At each of these time points, pups were killed and their lungs were harvested for determination of morphometric parameters or were frozen.

### ***RNA preparation, cDNA synthesis and microarray hybridization***

Total RNA was extracted from the entire lung tissue of each animal by using RNeasy Mini RNA extraction kit (Qiagen, Chatsworth, CA) and the protocols therein. Purified RNA was quantified using NanoDrop™ Spectrophotometer technology (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, Delaware).

For microarrays, total RNA was extracted from a pool of 2 or 3 lungs, on postnatal day 4, 10 and 21 from IUGR pups and a pool of control pups, performed as internal control. Total

RNA were hybridized to long oligonucleotides microarray following Nimblegen described protocols. A total of 390,000 oligonucleotides representing 26236 transcripts from the rat genome were hybridized with fluorescently labeled cDNAs from each lung (LPD group versus control) at each of the three time point. Image analysis was performed with the NimbleScan software (Nimblegen) and features intensities were exported as .pairfiles. Statistical analysis of differentially expressed genes (Student's t-test) was performed.

Total RNA was converted into cDNA by using Thermoscript RT-PCR system (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). RNA from each sample extract was reverse-transcribed into cDNA by using 500 ng of total RNA, Superscript III reverse transcriptase, and random hexamer primers (Invitrogen) according to the supplier's protocol. Realtime PCR was performed on an ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) using the following protocol: initial denaturation (10 min at 95°C), then two steps amplification program (15s at 95°C followed by 1 min at 60°C) repeated 40 times, and then dissociation process. Each reaction consisted of a cDNA equivalent of 0.5 µg of total RNA, 12.5µl SYBR Green PCR Master Mix and forward and reverse primers at 0.2 or 0.3 nM concentration in a reaction volume of 25µl. cDNA was used for relative quantification of different genes and of reference gene GAPDH and MMP16 expression. For RT-PCR, total RNA was extracted of lung analyzed in microarray and in 5 other animals for each time point from another dams.

Melt curve analysis was used to check that a single specific amplified product was generated. Relative expression was determined by using the  $\Delta\Delta C_t$  (threshold cycle) method for normalized samples ( $\Delta C_t$ ) relative to a calibrator sample, according to the manufacturer's protocol. Each PCR run included a no-template control and a sample without reverse transcriptase. All measurements were performed in triplicate.

Primers were designed using Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, Foster city, CA), to yield an amplicon of approximately 100 base-pair length. Real-time quantifica-

tion was performed by measuring the increase in fluorescence caused by the binding of SYBR Green dye to double stranded DNA at the end of each amplification cycle.

### ***Microarray analysis***

Pathway analysis was carried out using the GePS tool of the Genomatix portal (<http://www.genomatix.de/en.index.html>). Table of genes modified more than 2:1 or less than 1:2 were submitted as text files with the level of induction/repression.

### ***Functional clustering by DAVID (Database for Annotation and Visualization and Integrated Discovery)***

Two lists of genes induced or repressed twice or more in the lungs were submitted to the DAVID database (REF). Briefly, DAVID clusterizes genes from a list according to a series of keywords common to several genes from the list. The proportion of each keyword from the gene list submitted is compared with the proportion in the whole genome, making it possible to compute a P value. Then enrichment values are calculated as the geometric mean of the inverse log of each P value. These enrichment scores depend on the number of genes present in the list. Therefore, we used a simulation to define minimal enrichment thresholds enabling us to consider gene clusters given by DAVID for further analysis. The groups were considered as significant if they were above an enrichment value of 0.83 for the repressed genes and 2.01 for the induced genes.

### ***Promoter analysis***

In an attempt to identify master genes of the IUGR-induced deregulations, we proceed to an analysis of the predicted binding sites for transcription factors present in genes oppositely altered. The occurrence of binding sites for transcription factor was obtained from the MatInspector Genomatix software for the promoters of the 20 most induced and 20 most repressed genes at each time tested. To complete this analysis, a more specific search for “CCGC” motif known to be a site for methylation /demethylation enzymes was performed.



Promoter analysis was done with Genomatix software (Munich/Germany). All promoter sequences are derived from the promoter sequence retrieval database ElDorado (Release 4.9, Human Genome NCBI build 37/hg19). The DiAlignTF task of GEMS Launcher was used to check for conserved TFBSs between the human and mouse APP promoter sequence (Matrix Family Library, Version 8.0, Vertebrates; Genomatix: 690 matrices from 162 families). The Frameworker tool (GEMS Launcher) searches for all modules composed of two or more TFBSs in aligned promoter sequences. A module is defined as a set of two or more TFBSs with a defined order, distance range between the individual TFBSs, and strand orientation. A total of 727 matrices from 170 families (Matrix Family Library, Version 8.2, Vertebrates; Genomatix) were used for the analysis. The ModelInspector searches for all determined modules of TFBSs in the human promoter library (first approach: ElDorado 07–2009: 93372 promoter regions; second approach: ElDorado 02–2010: 97259 promoter regions; Genomatix Promoter Database).

### ***Western blot***

Whole lung tissues were homogenized in RIPA buffer containing protease inhibitors (Cell Signaling 9806S) to solubilize protein. Protein content was assessed with Biorad protein assay. Thirty micrograms of total proteins were electrophoresed on 15% SDS-polyacrylamide gel then transferred onto polyvinylidene-fluoride membranes (Millipore, Velizy, France). To document protein loading, membranes were stained with Ponceau S dye (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) and photograph prior to antibody incubations. After blocking with 5% non-fat dry milk in Tris-buffer saline containing 0.1% Tween-20 (TTBS) at room temperature for 1 hour, membranes were exposed to antibodies. Rabbit anti-FABP4 (Ab78428, Abcam plc, Cambridge, UK) and rabbit anti-NPPB (AB1549, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), goat anti-adiponectin (AF 3100, R&D systems, Abingdon, UK), washed in TTBS and exposed to horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit (GE Healthcare Life

sciences, Saclay, France) or anti-goat (HAF017 R&D systems, Abingdon, UK) and incubated in enhanced chemiluminescent reagent (GE healthcare Life Sciences Saclay, France) before exposure to G:Box (Syngene, Synoptics Ltd, Cambridge, UK).

### ***Immunohistochemistry***

Immunohistochemistry of peroxisome proliferator-activated receptor- alpha (PPAR $\alpha$ ) and von Willebrand factor was performed using the biotin/streptavidin Vectastain Elite ABC kit (Vector laboratories, Burlingame, CA) according to the manufacturer's instructions. Briefly the slides were dewaxed and rehydrated in graded ethanol solutions. Endogenous peroxidases were quenched by incubating the slides in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at room temperature for 10 minutes. Antigen retrieval was performed in boiling 10mM citrate buffer solution (pH 6.0). Sections were then blocked in PBS containing 2.5% normal horse serum for 20 minutes at room temperature. Sections were probed with PPAR $\alpha$  mouse anti rat monoclonal antibody (diluted 1:500, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, WA, USA) overnight or with anti-vWF mouse anti-rat monoclonal antibody (diluted 1:40, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, WA, USA) for two hours and incubated with biotinylated horse anti-mouse IgG antibody rat-absorbed (Vector Laboratories). Lung sections serving as negative controls received the same dilution of non-immune mouse IgG. The slides were incubated with HRP-conjugated streptavidin during 30 minutes. ImmPACT DAB (Vector Laboratories) was used as substrate for slides incubated with anti-PPAR $\alpha$ . NovaRED (Vector Laboratories) was used as substrate for slides incubated with anti-vWF. After counterstaining with hematoxylin, tissues sections were dehydrated and mounted. Light microscopy images were captured with a digital camera.

### ***Elastin quantification***

Paraffin embedded sections were stained for elastin using Weigert's stain. Sections were deparaffinized and hydrated, then soaked in Weigert's solution for 2 hours. After being washed in 95% ethanol, sections were differentiated with 1% acid-alcohol, sections were de-

hydrated in 100% ethanol, cleared in xylene and mounted. Sections were viewed by light microscopy. Stained elastic fiber density was determined manually after exclusion of large-vessel and airway elastin. Counter coloration with tartrazine as previously described was used.

## **Results**

### ***Intensity of the effects of IUGR at three key time points***

Considering a threshold of 2:1 as significant for induction or repression, 55 transcripts were found to be induced at day 4, 107 at day 10 and 449 at day 21, whereas 87 were found to be repressed at day 4, 24 at day 10 and 577 at day 21. To validate these findings, qRT-PCR were performed on 6 genes at the three time-points. Overall, a very good fit was found between the two approaches, suggesting a high robustness of microarrays based on long isothermic oligonucleotides. The calculated correlation  $r^2$  was estimated at 0,95 considering only the lungs analyzed in the microarray. To assess the external validity, we performed RT-PCR analysis on 10 others animals at each time points. The calculated correlation  $r^2$ , considering all the animals, was estimated at 0,8946.

### ***Systematic analysis of the microarray data***

To interpret the composition of the groups of induced and repressed genes, the automatic functional clustering tool developed by the National Institutes of Health, DAVID was used (10). A threshold for the enrichment index given by DAVID was calculated by a simulation as described previously.

Day 4:

Functional clustering of repressed genes reveals the existence of a cluster of genes involved in cell adhesion molecule (enrichment score= 2.79). This cluster corresponds to a group of 6 genes linked to the class I major histocompatibility complex (RT1 class I, CE11 (ratio 0.35); RT1 class Ia, locus A1 (ratio: 0.4); RT1 class I, CE15 (ratio: 0.52); RT1 class I, CE14 isoform 1 (ratio: 0.58); RT1 class I, T24, gene 4 (ratio: 0.6); RT1 class I, CE15 (ratio: 0.617)) and histocompatibility 2, T region (ratio: 0.60). Another cluster concerns 7 genes of the ribosomal protein family (enrichment score 2.83) sometimes by up to two different transcripts (ribosomal protein S26, S19, L19 and L18a: ratio 0.52 to 0.65). A third group of repressed gene concerns proteins of innate immunity in mammals with schlafen 3 (*Slfn3*) and oligoadenylate

synthetase 1A, 1B and 2 (ratio: 0.57 to 0.6). Functional clustering of induced genes reveals no known pathway.

#### Day 10

Functional clustering of repressed genes shows another time the modification of expression of genes involved in molecular adhesion and antigen presentation in the immunity process (enrichment score= 2.79). This time genes concerned are linked to the class II major histocompatibility complex (histocompatibility 2, class II antigen E alpha and B-1 beta chain precursor, class II antigen E alpha and RT1 classII, locusDb1, Bb and Da (ratio: 0.55 to 0.65)). Gene expression of others proteins involved in immunity like cystatin, ear 11, serum amyloid A, complement component 6 or lysozyme decreases (ratio 0.35 to 0.659). Interestingly, gene expression of some proteins like complement component 6 or *Spock3* was already decreased on day 4.

Functional clustering of induced genes shows the existence of cluster of genes of “cardiac muscle contraction” pathway (enrichment score 3.06) corresponding to cytoskeletal proteins: myosin heavy chain 6 and 7 and tropomyosin 1 alpha, I type 3 and T, type 2, myozenin 2 and actinin alpha 2, cardiac ankyrin repeat protein and titin N2A and triadin 95 or cytochrome oxidase subunit (ratio: 1.51 to 4.9). A second cluster of genes induced is which of the “Peroxisome Proliferative-Receptor Activated (PPAR)” pathway with 8 genes of this pathway significantly modified (enrichment score: 2.61): Fatty acid binding protein 3 and 4 (Fabp3 and 4), carnitine palmitoyltransferase 1b, acyl-coA synthetase long-chain family member 1 and the adipocyte complement related protein with the increase of two transcripts isoforms (ratio 1.65 to 7.55). These microarray results are validated by qRT-PCR for a series of genes of this pathway (Fatty Acid Binding Protein 3 and 4, and Acyl-CoA synthetase) presenting induction ratio varying on the microarray from 1.96 to 7.55 induction ratio.

#### Day 21

Functional clustering of repressed genes shows another time the modification of expression of 7 genes involved in “asthma” pathway (enrichment score= 2.41) concerning genes of IgE expression. At day 21, 7 genes of the PPAR pathway were significantly downregulated, confirmed by qRT-PCR analysis with ratio varying from 0.18 to 0.79 on microarray analysis. Functional clustering of induced genes shows the existence of cluster of genes of “cell adhesion molecule” pathway.

Search for common features in the promoter of IUGR induced and repressed genes: statistical analysis ???

To find logic in the network of gene inductions observed in IUGR, we compared the composition in putative transcription factor Binding Site (TFBS) in the promoters of the 20 most induced genes versus the 20 most repressed genes (or all induced or repressed genes: results are the same). The promoters were recovered using the Genomatix ModelInspector procedure (<http://www.genomatix.de/>). The putative binding sites that were most enriched in both induced and repressed genes are V\$SP1F and V\$ETSF. None modification of transcripts expression for Sp1 protein or his cofactor have been noticed in the microarray analysis. Similarly, none of the TATA box family members were modified.

Search for chromosome induced modification: Statistical analysis ?

We analyzed the effects of low protein diet induced-IUGR in rat pups on a chromosome per chromosome basis to identify possible bias in abnormal gene expression.. The strongest biases were found for chromosomes 1 and 5 at day 4 and 21. For chromosome 5, the explanation for discrepancy resides in the concentration of deregulated genes in one locus: 5q36. Analysis reveals another cluster of deregulated gene in the locus 20p12. This locus contains numerous genes of the Major histocompatibility complex (MHC) in rats.

Analysis of specific group of genes

We investigated five groups of genes, encoding epigenetic regulators as DNA methyltransferases, histone deacetylases, histone methyl- and acetyl-transferase, bromodomain-containing proteins recognizing acetylated lysine residues in particular in his-

tone tails and chromodomain-containing proteins recognizes methylated histones and appears in the RISC complex. These proteins are important epigenetic regulators associated either with opened chromatin or closed chromatin for bromodomains and chromodomains, respectively. None of the studied genes are modified in the lungs at the three postnatal days analyzed.

We analyzed the effects of low protein diet maternal diet induced-IUGR in the rat model on a chromosome per chromosome basis, to identify possible bias in abnormal gene expression. For the three analyzed key time points, a deregulation of regions of 5q36 and 20p12 were observed.

#### Localization of PPAR alpha

Immunohistochemistry at day 10 in the lungs shows a ubiquitous expression of PPAR alpha.

The expression of PPAR alpha is in the Clara cells, in endothelial cells of veins (only for IUGR) and in the smooth muscle cells. The intracellular localization as previously shown is intracytoplasmic and in the nucleus.

#### Proteomic analysis

All analyzed proteins are present in the whole lung homogenates at the three key time points.

Western blot analysis reveals a significant increase of FABP4 at day 4 in the LPD group, and a slight decrease at day 10 in the LPD group compared to controls. Concerning adiponectin, protein analysis shows no difference at day 4 and 10 and a significant increase at day 21. For NPPB, no differences are observed at any time.

#### Functional consequences

Elastin content analysis shows a significant decrease in elastin content evaluated at the end of the alveolarization process at day 21 ( $p=0.0119$ ). Vascular density analyzed by immunohistochemistry with anti von Willebrand Factor reveals a significant decrease at day 21 in parallel to alveolarization decrease ( $p=0.0159$ ).

## Discussion

We have previously shown that LPD model fits very well with alveolarization disorder in induced intrauterine growth restriction in rat pups but transcriptomic analysis reveals that genes known to control alveolarization process are not modified. Therefore, we performed a microarray analysis at three key time points of postnatal alveolarization process at day 4, 10 and 21. The analysis reveals a new pathway in alveolarization disorder modified at the three key time points: the transcription factor PPAR alpha (peroxisome proliferative-associated receptor). At our knowledge it is the first study to perform a genome wide analysis in alveolarization disorder induced by IUGR.

Our microarray analysis demonstrated that PPAR pathway genes were modified at the three studied time-points. At day 4, gene expression of Fatty Acid Binding Protein 3 (FABP3) is up-regulated. This molecule is a downstream of the PPAR pathway. Interestingly, FABP4, an activator of the PPAR pathway is up-regulated in IUGR rat pups at day 4 for protein but not for mRNA expression. In an inflammatory model of BPD in baboon and in human with BPD, an increased density of FABP4 positive peribronchial blood vessels was observed as an increase of FABP4-content of macrophages in bronchoalveolar lavage fluid samples (14). At day 10, eight genes of the specific PPAR pathway are up-regulated. Among them, adiponectin has been involved in chronic obstructive pulmonary disease (COPD)(13) and adiponectin deficient mice develop pulmonary hypertension (22); Adiponectin is known to inhibit immune (5) and exert protective effects on endothelial activation and inflammation attenuating adhesion of monocytes to their surface (24). Adiponectin modulates the process of vascular remodeling by directly affecting the phenotypes of vascular smooth muscle cells (24). However, in our study, there is a discrepancy between the gene expression and the protein analysis. This could be explained by two mechanisms: 1) latency can be observed between the gene expression increase and the protein synthesis and the increase of adiponectin, in term of proteins, at day 21 can be a result of previous mRNA expression increase 2) different state of polymeriza-



tion had been observed for adiponectin as low, middle and high molecular weight (7) but we focused only on the lower state of it.

The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) are nuclear lipid-activable receptors and belong to the steroid/ thyroid/ retinoid receptor superfamily (2). PPARs control energy homeostasis and are important regulators of adipogenesis (catabolism via beta-oxidation or storage), lipid metabolism, inflammatory responses and hematopoiesis (2). They are implicated in chronic diseases such as diabetes, obesity and atherosclerosis (2). There are three family subtypes ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) and this family is ubiquitous (2). PPAR mRNA expression in human fetal lung did not change with age during embryonic period (1). PPAR $\alpha$  is the most highly expressed isotype and the protein levels decreased with fetal age (1). PPAR $\alpha$  activation can be regulated by endogenous ligands, such as different unsaturated fatty acids (e.g. oleic acid and linoleic acid), which can activate the three PPAR isotypes, and the arachidonic acid derivative leukotriene B4 (LTB4), which is a specific ligand of the PPAR $\alpha$  isotype (2). Many agonists and antagonists of PPAR  $\alpha$  and  $\gamma$  had been developed (2). Administration of PPARs agonists in fibroblasts cultured cells from 8 days old rats decrease tropoelastin mRNA expression and its protein as elastin gene transcription (20). During the alveolar stage of lung development, lipid droplet-laden interstitial cells are present at the base of elongating alveolar septa. These cells that have been named lipid interstitial cells or lipofibroblasts may supply lipids for surfactant production, the synthesis of membranes phospholipids and/or energy metabolism. They also have myofibroblastic characteristics and participate in the generation of the interstitial elastic fiber network that is in the pulmonary alveolar septum. PPARs agonists treatment also decrease  $\alpha$ -smooth muscle actin mRNA (20). This molecule is characteristic of myofibroblasts. Therefore, exposure of fibroblasts to PPARs agonists alters the fibroblasts phenotype (20). These results are in concordance with the decrease in elastin fiber density observed here with Weigert coloration.

Using vWF antibody for immunohistochemistry, we showed a significant decrease in vascularization of the end of the alveolarization process. Treatment with PPAR $\alpha$  agonist, fenofibrate, of human microvascular endothelial cell line, inhibits endothelial cell proliferation and migration, inhibits capillary tube formation and inhibits angiogenesis in vivo (34). Fenofibrate acts through disorganization of cytoskeleton protein with actin depolymerization (34).

Among the 107 up-regulated genes at day 10, 12 are cytoskeleton structure proteins, among them 8 are found in smooth muscle cells. Many had been described in lung development and are necessary to it. The pattern expression of smooth muscle myosin corresponds with the distribution of smooth muscle by general histologic criteria with moderate reactivity with the smooth muscle coat of the airways and a preference for the more muscular coat of the arteries versus the veins during the saccular and alveolar stage (23). It appears that the acquisition of myosin is correlated with the degree of differentiation of the smooth muscle cells population (23). Interestingly, the overexpression of CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance) in normal fetal rat lungs induced an increase of the cytoskeletal proteins in common with our observation (Tmpl, MLC2a, Myh7) involved in muscle structure and function resulting in accelerated differentiation and maturation of the neonatal rat lung (5).

The effect of maternal protein restriction during pregnancy has been investigated in neonatal (D0) and adult (D105) rat heart. There was a significant effect of antenatal maternal diet on PPAR $\alpha$  mRNA expression in adult heart (28). PPAR $\alpha$  expression increases in adult male and female offspring of LPD dams but is not modified in neonatal heart (28). Moreover, there are no differences between maternal dietary groups in the mRNA expression of any of the genes measured in neonatal hearts (28). The expression of all of the genes measured differed between adult and neonatal hearts which is consistent with maturation of specific regulatory pathways in lipid and carbohydrate metabolism during postnatal heart development

(26). Thus the offspring of LPD dams may have greater capacity for energy production from fatty acids. In heart, PPAR $\alpha$  promoter methylation was reduced in both adult and neonatal hearts from the offspring of LPD dams (28). This suggests that altered regulation of PPAR $\alpha$  was induced before birth, but the effects on its mRNA expression were only detected later, possibly as a result of developmentally programmed induction of PPAR $\alpha$  expression in response to increased fatty acid availability after birth as shown in rat liver (25). Microarray analysis has been performed in several organs right before birth (E21) in a LPD model in rat (33). The results show that the lung is the organ, among liver, placenta, kidney and heart, with the greatest number of modified transcripts expression (33). A more in depth analysis in modified pathways shown antenatal deregulation of PPAR pathway with 4 genes expression already modified and beyond them PPAR $\alpha$  itself is down-regulated (33).

PPAR $\gamma$  agonists have been administered to rat pups and their lung development has been assessed. PPAR $\gamma$  is expressed in multiple cell types including monocytes, endothelial and smooth muscle cells where it regulates proliferation and vascular tone. Postnatal ablation of PPAR $\gamma$  in the rodent airway epithelium disrupts development resulting in enlarged airspaces and decrease tissue resistance (27). Chronic moderate hyperoxia model can induce enlarged airspaces like BPD in mouse pups (30). Neonates' treatment with rosiglitazone a specific PPAR $\gamma$  agonist, via their own mother breast milk, up-regulate PPAR $\gamma$  target gene and increase partially alveolar and vascular density at D41 (30). Daily administration of rosiglitazone in rat pups results in enhancement of alveolarization and angiogenesis in a dose dependant manner (35).

Cell adhesion molecules pathway is another pathway modified at the three time points analyzed. IUGR preterm babies have quantitative deficient innate immune systems (31). Moreover, many studies show an increase susceptibility to infection of IUGR infants with an increase risk of sepsis multiplied by 2.4 to 3 (6). PPARs isoforms using agonist-dependent

mechanisms have been shown to trans-repress the activities of many activated transcription factors, including nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). PPARs are known to play a role in innate and adaptative immunity (8). Using both genetic (PPAR  $\alpha$ -/- knock out mouse) and pharmacological approaches, it has been shown that PPAR $\alpha$  downregulates cell infiltration by neutrophils and macrophages, chemoattractant production triggered by lipopolysaccharide nasal instillation in mouse lung (9). The disruption of NF- $\kappa$ B signaling in 6 days old mice induced an alveolar simplification similar to that observed in BPD and significantly reduced pulmonary capillary density (16). Adiponectin can also down-regulates the MCHII in pre-conditioned dendritic cells (32).

Interestingly, the two most modified gene expression factors, on D21, are atrial natriuretic peptide precursor (Nppa) and brain natriuretic peptide precursor (Nppb) with induction ratios of 188.92 and 48.58 respectively (12). Chronic treatment of rats with suprapharmacological doses of a dual PPAR  $\alpha/\gamma$  agonist induces the increase of Nppa and Nppb mRNA transcripts in a dose dependant manner (12). Western blot for brain natriuretic factors reveals his expression in the lung but did not show any differences between groups. However, BNP is a small molecule secreted in the blood and the study of whole blood lung homogenates might not be the best way to study BNP secretion.

Specificity Protein 1 (SP1F) is a ubiquitous transcription factor and belongs to a family of C(2)H(2)-type finger-containing DNA binding proteins that activate or repress transcription of many genes in response to physiological and pathological stimuli. There is emerging evidence to indicate that in addition to functioning as “housekeeping “ transcription factors, members of Sp family may be key mediators of gene expression induced by insulin or others hormones especially hormones of the HPA axis. Sp1/Sp3-binding motifs are frequently present in the promoter/enhancers of the hyperinsulinemia-associated genes and they have probably a key role in hyperinsulinemia and metabolic syndrome (29). The ETS (E-twenty six

family) is one of the largest families of transcription factors and is ubiquitous. The ETS family is involved in a wide variety of functions including the regulation of cellular differentiation, cell cycle control, cell migration, cell proliferation, apoptosis and angiogenesis.

Using a well-known model of IUGR induced by protein restriction during pregnancy, we show pulmonary consequences with a decrease in both alveolarization and vascularization. The microarray analysis performed at three key time points of lung development reveals the involvement of postnatal PPAR $\alpha$  deregulated pathway.

## References

1. **Abbott BD, Wood CR, Watkins AM, Das KP, and Lau CS.** Peroxisome proliferator-activated receptors alpha, Beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissues. *PPAR research* 2010.
2. **Barak Y, and Lee CH.** The Molecular Basis of PPAR Function. *PPAR research* 2010: 510530.
3. **Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, and Osmond C.** Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 31: 1235-1239, 2002.
4. **Buffat C, Boubred F, Mondon F, Chelbi ST, Feuerstein JM, Lelievre-Pegorier M, Vaiman D, and Simeoni U.** Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes. *Endocrinology* 148: 5549-5557, 2007.
5. **Cohen JC, and Larson JE.** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) dependent cytoskeletal tension during lung organogenesis. *Dev Dyn* 235: 2736-2748, 2006.
6. **Damodaram M, Story L, Kulinskaya E, Rutherford M, and Kumar S.** Early adverse perinatal complications in preterm growth-restricted fetuses. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 51: 204-209.
7. **Daniele A, De Rosa A, Nigro E, Scudiero O, Capasso M, Masullo M, de Laurentiis G, Oriani G, Sofia M, and Bianco A.** Adiponectin oligomerization state and adiponectin receptors airway expression in chronic obstructive pulmonary disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44: 563-569.
8. **Daynes RA, and Jones DC.** Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nature reviews* 2: 748-759, 2002.
9. **Delayre-Orthez C, Becker J, Guenon I, Lagente V, Auwerx J, Frossard N, and Pons F.** PPARalpha downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse. *Respiratory research* 6: 91, 2005.
10. **Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, and Lempicki RA.** DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome biology* 4: P3, 2003.
11. **Diaz V, Lebras-Isabet MN, and Denjean A.** Effect of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced intrauterine growth restriction on postnatal lung growth in rats. *Pediatr Res* 58: 557-561, 2005.
12. **Engle SK, Solter PF, Credille KM, Bull CM, Adams S, Berna MJ, Schultze AE, Rothstein EC, Cockman MD, Pritt ML, Liu H, Lu Y, Chiang AY, and Watson DE.** Detection of left ventricular hypertrophy in rats administered a peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonist using natriuretic peptides and imaging. *Toxicol Sci* 114: 183-192.
13. **Garcia P, and Sood A.** Adiponectin in pulmonary disease and critically ill patients. *Current medicinal chemistry* 19: 5493-5500.
14. **Ghelfi E, Karaaslan C, Berkelhamer S, Akar S, Kozakewich H, and Cataltepe S.** Fatty acid-binding proteins and peribronchial angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45: 550-556.
15. **Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, and Thornburg KL.** Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 359: 61-73, 2008.
16. **Iosef C, Alastalo TP, Hou Y, Chen C, Adams ES, Lyu SC, Cornfield DN, and Alvira CM.** Inhibiting NF-kappaB in the developing lung disrupts angiogenesis and alveolarization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302: L1023-1036.
17. **Jobe AH, and Bancalari E.** Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 1723-1729, 2001.

18. **Maritz GS, Cock ML, Louey S, Joyce BJ, Albuquerque CA, and Harding R.** Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis. *Pediatr Pulmonol* 32: 201-210, 2001.
19. **Maritz GS, Cock ML, Louey S, Suzuki K, and Harding R.** Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep. *Pediatr Res* 55: 287-295, 2004.
20. **McGowan SE, Jackson SK, Doro MM, and Olson PJ.** Peroxisome proliferators alter lipid acquisition and elastin gene expression in neonatal rat lung fibroblasts. *Am J Physiol* 273: L1249-1257, 1997.
21. **McMillen IC, and Robinson JS.** Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85: 571-633, 2005.
22. **Medoff BD, Okamoto Y, Leyton P, Weng M, Sandall BP, Raher MJ, Kihara S, Bloch KD, Libby P, and Luster AD.** Adiponectin deficiency increases allergic airway inflammation and pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41: 397-406, 2009.
23. **Mitchell JJ, Reynolds SE, Leslie KO, Low RB, and Woodcock-Mitchell J.** Smooth muscle cell markers in developing rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 515-523, 1990.
24. **Ohashi K, Ouchi N, and Matsuzawa Y.** Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin. *Biochimie* 94: 2137-2142.
25. **Panadero M, Herrera E, and Bocos C.** Different sensitivity of PPARalpha gene expression to nutritional changes in liver of suckling and adult rats. *Life Sci* 76: 1061-1072, 2005.
26. **Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, and Taegtmeyer H.** Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart failure reviews* 12: 331-343, 2007.
27. **Simon DM, Tsai LW, Ingenito EP, Starcher BC, and Mariani TJ.** PPARgamma deficiency results in reduced lung elastic recoil and abnormalities in airspace distribution. *Respiratory research* 11: 69.
28. **Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA, Townsend PA, Torrens C, Hoile SP, Hanson MA, and Burdge GC.** Feeding a protein-restricted diet during pregnancy induces altered epigenetic regulation of peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha in the heart of the offspring. *Journal of developmental origins of health and disease* 2: 250-255.
29. **Solomon SS, Majumdar G, Martinez-Hernandez A, and Raghoebar R.** A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. *Life Sci* 83: 305-312, 2008.
30. **Takeda K, Okamoto M, de Langhe S, Dill E, Armstrong M, Reisdorf N, Irwin D, Koster M, Wilder J, Stenmark KR, West J, Klemm D, Gelfand EW, Nozik-Grayck E, and Majka SM.** Peroxisome proliferator-activated receptor-g agonist treatment increases septation and angiogenesis and decreases airway hyperresponsiveness in a model of experimental neonatal chronic lung disease. *Anat Rec (Hoboken)* 292: 1045-1061, 2009.
31. **Troger B, Muller T, Faust K, Bendiks M, Bohlmann MK, Thonissen S, Herting E, Gopel W, and Hartel C.** Intrauterine Growth Restriction and the Innate Immune System in Preterm Infants of  $\leq 32$  Weeks Gestation. *Neonatology* 103: 198-203.
32. **Tsang JY, Li D, Ho D, Peng J, Xu A, Lamb J, Chen Y, and Tam PK.** Novel immunomodulatory effects of adiponectin on dendritic cell functions. *International immunopharmacology* 11: 604-609.
33. **Vaiman D, Gascoin-Lachambre G, Boubred F, Mondon F, Feuerstein JM, Ligi I, Grandvuillemin I, Barboux S, Ghigo E, Achard V, Simeoni U, and Buffat C.** The intensity of IUGR-induced transcriptome deregulations is inversely correlated with the onset of organ function in a rat model. *PLoS One* 6: e21222.

34. **Varet J, Vincent L, Mirshahi P, Pille JV, Legrand E, Opolon P, Mishal Z, Soria J, Li H, and Soria C.** Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cell Mol Life Sci* 60: 810-819, 2003.
35. **Wang Y, Santos J, Sakurai R, Shin E, Cerny L, Torday JS, and Rehan VK.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists enhance lung maturation in a neonatal rat model. *Pediatr Res* 65: 150-155, 2009.
36. **Zeitlin J, El Ayoubi M, Jarreau PH, Draper ES, Blondel B, Kunzel W, Cuttini M, Kaminski M, Gortner L, Van Reempts P, Kollee L, and Papiernik E.** Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *J Pediatr* 157: 733-739 e731.



Table 1: Abnormal regulation of the PPAR pathway in the lungs of LPD-induced IUGR rats compared to controls (PPAR signaling KEGG pathway), with induction or repression ratios derived from rat microarray data.

P4 Repressed	P4 Induced	P10 Repressed	P10 Induced	P21 Repressed	P21 Induced
	<i>Fabp3</i> x2.06		<i>Acyl coA synthetase</i> x1.81	<i>Adiponectin</i> x0.18	
			<i>Adiponectin</i> x6.86	<i>Aquaporin 7</i> x0.33	
			<i>Aquaporin 7</i> x2.09	<i>Carnitine palmytoyl transferase 1b</i> x0.28	
			<i>Fabp3</i> x2.99	<i>Fabp4</i> x0.18	
			<i>Fabp4</i> x7.55	<i>Stearoyl- coenzyme A desaturase 3</i> x0.41	
			<i>PPAR<math>\alpha</math></i> x1.67	<i>Solute carrier family 27</i> x0.38	
			<i>Phosphoenol pyruvate carboxykinase</i> x1.86	<i>Uncoupling protein 1</i> x0.01	

Table 2: Putative TFBS enriched in genes induced or repressed in LPD-induced IUGR in the lung at the three key time-points, for pairs of homodimers or heterodimers

		ETSF_ETSF	ETSF_SP1F	SP1F_SP1F
P4	Repressed	7	4	11
	Induced	5	4	2
P10	Repressed	3	4	2
	Induced	11	13	1
P21	Repressed	5	1	1
	Induced	2	3	1

Table 3: More frequent putative TFBS enriched in genes induced or repressed in LPD-induced IUGR in lung at the three key time-points

		ETSF	KLFS	NFKB	SP1F
P4	Repressed	42	24	46	71
	Induced	41	20	18	60
P10	Repressed	28	7	10	36
	Induced	95	44	30	126
P21	Repressed	21	4	6	8
	Induced	27	2	11	12

Table 4: Distribution biases of deregulated genes by chromosome

Chromosome	P 4 p=	P10 p=	P21 p=
1	0.3	0.17	0.82
2	0.07	0.04	0.51
3	0.05	0.93	0.5
4	0.55	0.41	0.0069
5	2.5301E-18	0.39	0.87
6	0.64	0.21	0.18
7	0.57	0.68	0.753
8	0.94	0.65	0.6
9	0.49	0.86	0.49
10	0.65	0.35	0.18
11	0.21	0.00066903	0.57
12	0.3	0.82	0.14
13	0.35	0.14	0.0014
14	0.4	0.4	0.81
15	0.75	0.77	0.088
16	0.65	0.79	0.489
17	0.37	0.4	0.33
18	0.24	0.75	0.8
19	0.43	0.044	0.49
20	0.08	4.6025E-05	0.5
X	0.63	0.19	0.07

## Figure legends

**Figure 1: Alterations of the transcriptome in the lung at three postnatal time-points before (P4), during (P10) and after alveolarization (P21).** Graphs represent the number of genes induced (red) or repressed (blue) at three key time-points of the alveolarization process. The intensity of deregulation is shown.

**Figure 2: qRT-PCR analysis of cDNA prepared from rat lungs at three postnatal time-points.**

cDNA was extracted from whole lung homogenates of ten rat pups at P4, P10 and P21 in the low protein diet group and controls. Comparison of induction ratios between qRT-PCR and microarray analysis data was performed for nine genes induced or repressed. The graph presents the correlation between the two methods of gene expression analysis, suggesting a very good fit between the two methods.

**Figure 3: Western blot analysis of Fabp4 protein level in the whole lung of rat pups exposed to low protein diet-induced IUGR or control diet.** Pups were killed at various postnatal ages: P4, P10 or P21. A: Representative blots obtained with five LPD-induced IUGR and controls. Beta-actin signal was used as a protein loader control. B: Densitometric analyses of the five blots are shown on the right side. Values represent means of five animals per group. Significance for each time-point is indicated by p values, two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

**Figure 4: Western blot analysis of Adiponectin protein level in the whole lung of rat pups exposed to low protein diet-induced IUGR or control diet.** Pups were killed at various postnatal ages: P4, P10 or P21. A: Representative blots obtained with five LPD-induced IUGR and controls. Beta-actin signal was used as a protein loader control. B: Densitometric analyses of the five blots are shown on the right side. Values represent means of five animals per group. Significance for each time-point is indicated by p values, two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

**Figure 5: Von Willebrand Factor immunohistochemistry in tissue sections in five IUGR rat pups and five controls at postnatal day 21.** A: Photographs of the alveolar region, taken at the same magnification, are presented for each group: low protein diet-induced IUGR or control. B: Quantitative analyses of number of vessels per field for five animals are shown on the right side. Large vessels were excluded. Results are expressed as the number of vessels per field for five animals per group. Significance is indicated by p values, two-tailed Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ ).

## Figures

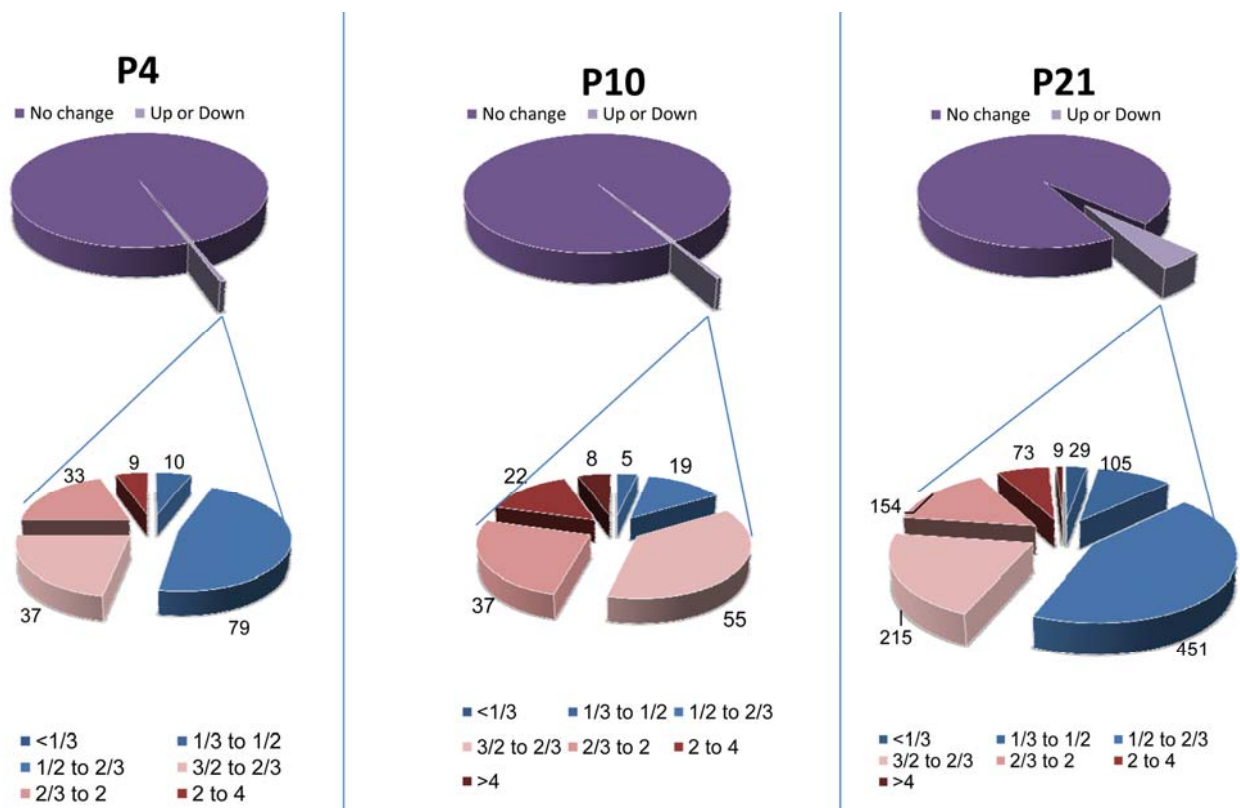


Figure 1

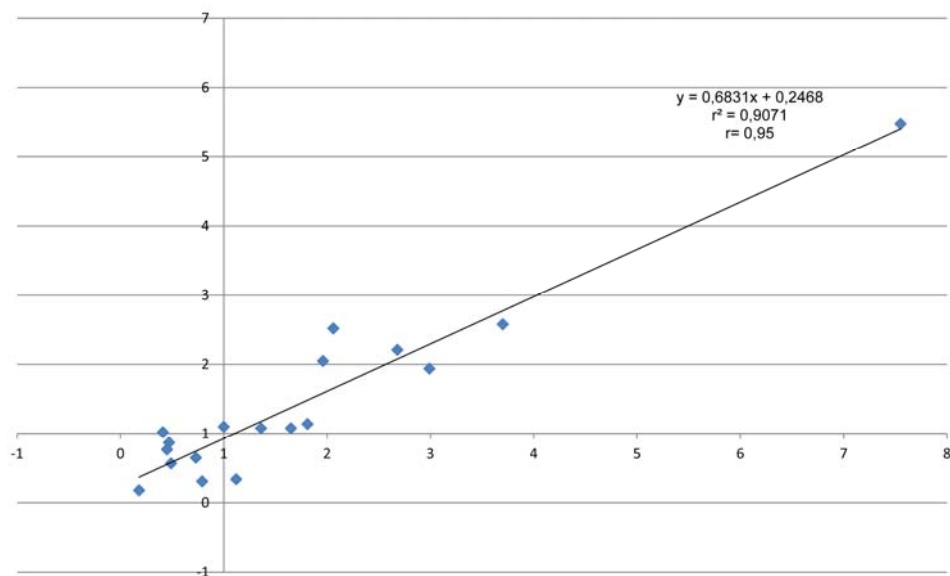
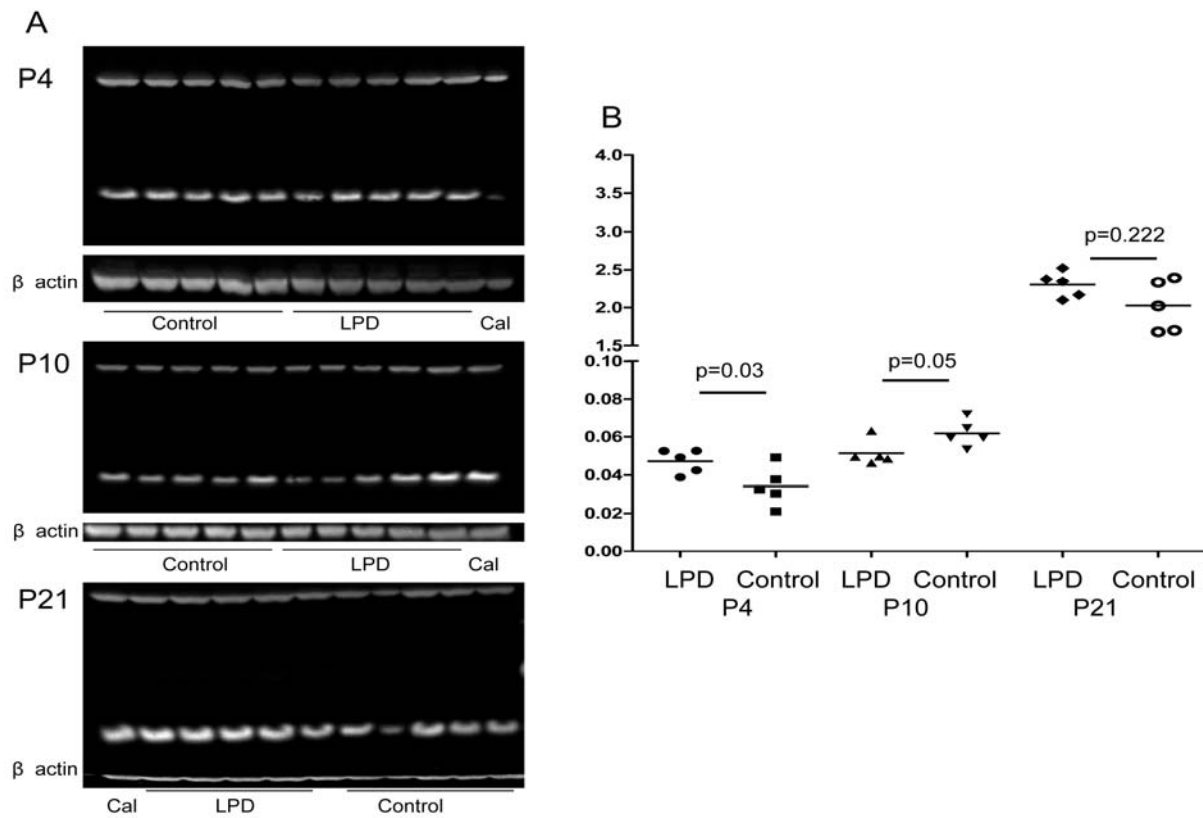
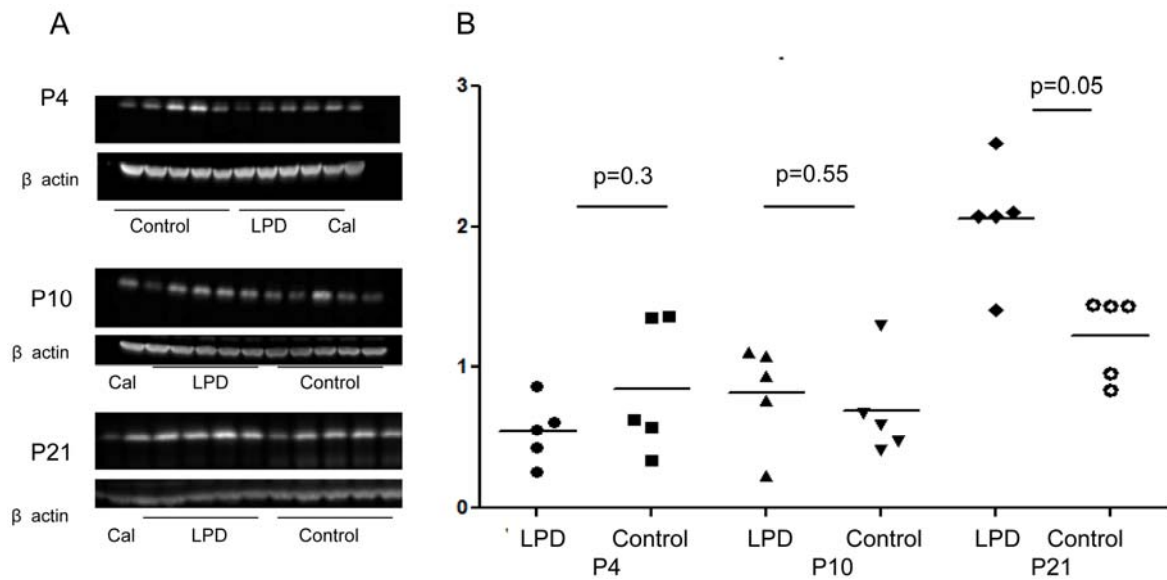


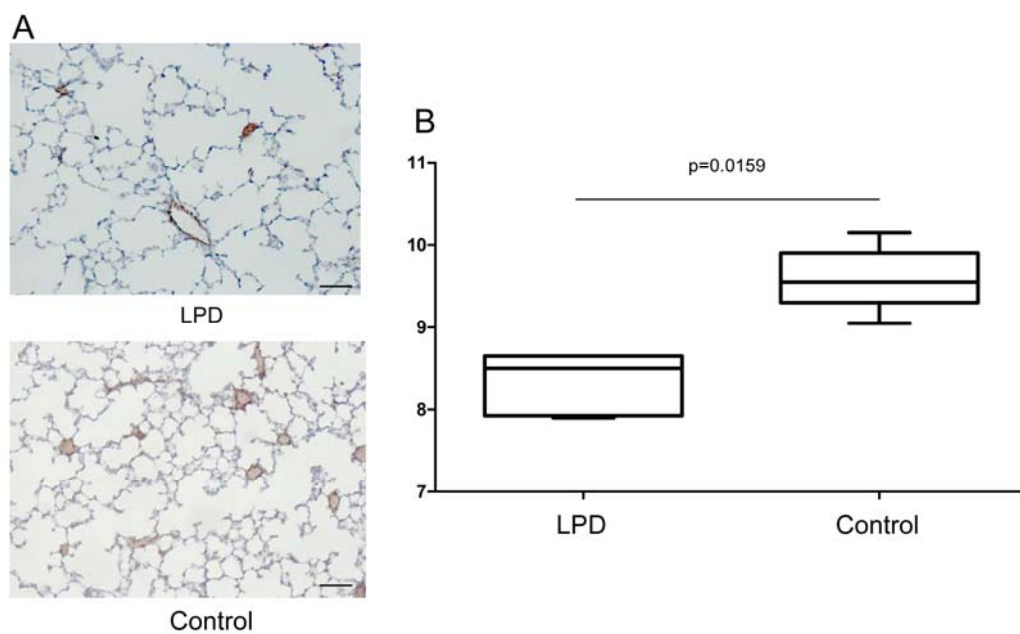
Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

## **Article 3**

# **Low Platelet Count : an Indirect “Risk Factor” of Bronchopulmonary Dysplasia in Extreme- ly Preterm infants**

(En préparation)



## Résumé

Le but de ce travail a été multiple :

- identifier les facteurs de risque de DBP dans une population très homogène prise en charge dans un seul centre afin de s'affranchir des différences de pratiques pouvant interférer dans l'évolution de cette pathologie,
- évaluer les taux de DBP dans cette population afin d'estimer le nombre de sujets nécessaires pour une étude clinique prospective (protocole Angiodys).

L'étude a donc inclus 335 enfants nés inborn avant 28SA à la Maternité Port-Royal. Après exclusion, 184 enfants ont été étudiés dont 40 étaient atteints d'un RCIU d'origine vasculaire avec une excellente concordance entre les données cliniques et l'examen anatomo-pathologique du placenta.

Cette étude confirme le lien entre le RCIU causé par une pathologie vasculaire de la grossesse et la DBP avec un risque multiplié par 5,23 par rapport aux témoins eutrophes. Cette étude montre aussi la nécessité de poursuivre dans le cadre d'une autre étude les explorations biologiques puisque pour la première fois, la thrombopénie apparaît comme un potentiel marqueur indirect de DBP à la naissance, reflétant un taux élevé de marqueurs anti-angiogéniques circulants.

Cette étude a de nombreuses limites et a amené beaucoup de questionnements :

- caractère monocentrique ;
- choix des témoins car la diversité des étiologies de RCIU rend difficile la comparaison entre une cohorte de RCIU d'origine non-vasculaire et d'origine vasculaire ;

I

## Low Platelet Count : an Indirect “Risk Factor” of Bronchopulmonary Dysplasia in Extremely Preterm infants

E. Zana-Taïeb <sup>1,2,3,4</sup>, MD; MS Aubelle <sup>1,2,4</sup>, MD; C Pierron <sup>1,2,4</sup>, MD; G Terrasse <sup>5</sup>, MD; C Depinay-Dhellemmes <sup>5</sup>, MD; M. El Ayoubi <sup>1,2,6</sup>, MD; J Patkaï <sup>1,2</sup>, MD; F Goffinet <sup>2,6,7</sup>, MD, PhD; G Moriette <sup>1,2</sup>, MD; PH Jarreau <sup>1,2,3,4</sup>, MD, PhD; E Lopez <sup>1,2</sup>, MD, PhD

1: Service de Médecine et Réanimation néonatales de Port-Royal. Groupe hospitalier Cochin, Broca, Hôtel-Dieu. Assistance Publique – Hôpitaux de Paris. Paris, France

2: PremUp. Paris, France

3: Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) U676. Paris, France

4: Université Paris Descartes. Paris, France

5 : Service d’anatomie et cytologie pathologiques, hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

6 : Maternité de Port-Royal, Groupe Hospitalier Cochin-Broca-Hôtel Dieu, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris.

7: Unité de recherche épidémiologique en santé périnatale et en santé des femmes et des enfants, INSERM U953

### **List of abbreviations**

AGA: appropriate for gestational age

C section: cesarean section

CPAP: continuous positive airway pressure

BPD: bronchopulmonary dysplasia

DR: delivery room

ELBW: Extremely low birthweight

HELLP: Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low platelet count

HFOV: high frequency oscillation ventilation

IUGR: intrauterine growth restriction

Mk: megakaryocytes

NICU: neonatal intensive care unit

PDA: patent ductus arteriosus

PE: preeclampsia

PlGF: placental growth factor

pPROM: Premature prolonged rupture of membranes

sEng: soluble endoglin

SGA: small for gestational age

sFlt1: soluble fms-like tyrosine kinase-1

TGF beta: Transforming growth factor

VEGF: vascular endothelial growth factor

### **Acknowledgments**

The author gratefully acknowledges Dr P Toubas for careful review of the manuscript.

### **Competing interest statement**

The authors have no competing interest to declare.

## INTRODUCTION

The radiologic description of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in preterm infant was first described in 1967 by Northway (Jobe and Bancalari 2001). Despite much progress with the use of antenatal corticosteroids, incidence did not decrease in part because of the resuscitation of more extremely preterm babies (ELBW). Bronchopulmonary dysplasia is a multi-factorial disease and its most important risk factor is gestational age (Jobe and Bancalari 2001). Recently, intra uterine growth restriction (IUGR) has also been recognized in population based studies as crucial risk factor in BPD pathogenesis, increasing the risk by 1.87 to 9.18 (Lal, Manktelow et al. 2003, Reiss, Landmann et al. 2003, Zeitlin, El Ayoubi et al. 2010, Durrmeyer, Kayem et al. 2011). It prolongs the duration of mechanical ventilation in preterm infants younger than 32 weeks of gestation (Gortner, Wauer et al. 1999). Moreover, the MO-SAIC study shows that risk of BPD declined continuously with increasing birthweight (Zeitlin, El Ayoubi et al. 2010).

Most studies use the small for gestational age (SGA), defined as a birthweight below 10<sup>th</sup> percentile for gestational age within their own samples (Lal, Manktelow et al. 2003, Garite, Clark et al. 2004) or from published birthweight curves (Reiss, Landmann et al. 2003, Zeitlin, El Ayoubi et al. 2010, Durrmeyer, Kayem et al. 2011). Other studies use the 10<sup>th</sup> percentile of intrauterine curves or birthweight derived from healthy populations (Ferdynus, Quantin et al. 2009). Epidemiological research has recently refined the gestational birthweight standard for to assess birthweight based not on population average but rather on individual growth potential calculated for each baby in each pregnancy. This is based on 3 principles (Gardosi 2009). The standard value is customized infant's sex and maternal characteristics such as height, weight, parity, and ethnic origin<sup>[MS1]</sup> (Resnik 2007). Pathological factors such as smoking, hypertension, diabetes, and preterm delivery are excluded. The term optimal weight is pro-

jected for all gestational age points, using an ultrasound growth based proportionality curve. Thus, pregnancies with a pathological outcome (as preterm birth) which consequently do not represent the real growth potential are excluded (Gardosi 2009).

The leading cause of IUGR is preeclampsia (PE). Until now, most of the studies failed to demonstrate a link between BPD and IUGR induced by preeclampsia. However, they may share common pathophysiological mechanisms linked to the synthesis by the placenta of anti-angiogenic factors, as sFlt1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1), the soluble form of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 1 or sEng (soluble Endogline), an endothelial receptor for transforming growth factor beta (Hertig and Liere , Maynard, Min et al. 2003). The direct consequence of these anti-angiogenic factors is a relative concomitant fall in VEGF and placental growth factor (PlGF) in the maternal serum (Hertig and Liere). Thebaud et al. have shown that VEGF blockade impairs alveolar development in newborn rats (Thebaud, Ladha et al. 2005). In human, the magnitude of excess sFlt-1 in maternal serum not only correlates with the severity of PE (Maynard, Min et al. 2003), but serum levels of sFlt-1 in the mother are also inversely related to gestational age, birthweight (Tsao, Wei et al. 2005) and platelet count at birth (Tsao, Wei et al. 2005).

The aim of our study is 1/ analyze the BPD and the morbidities rates of SGA inborn infants delivered before 28 weeks of gestation as compared with AGA infants, 2/ analyze BPD risk factors including PE. Our hypothesis is that preeclampsia increases the risk of BPD in IUGR very preterm newborn.

## METHODS

This study included all infants from 23 to 27 weeks of gestation (Level III perinatal center) born and cared in the NICU at the Cochin Port Royal Hospital between January 1<sup>st</sup> 2005 and December, 31 2009. Data were retrospectively collected in the Neonatal Unit database by attending practitioners. Infants were observed until discharge home from hospital or into long-term care or death.

### Maternal data/variables

Data were obtained from the obstetric medical record. Maternal data (other than cause of pre-term birth) included age, ethnic origin (classified in seven groups: European, African, African Caribbean, Indian, Pakistani, Bangladeshi, Mixed or other), gravity and parity, height and weight before pregnancy. Prenatal steroids were considered to have been administered if at least one betamethasone injection was given 12 hours before delivery. Gestational age was estimated by the first trimester ultrasound if available or last menstrual date if the ultrasound was not available.

Two type of vascular disorders were identified: preeclampsia defined by hypertension and proteinuria (protein >0.3 g in a 24-hour collection), Hellp syndrome defined by the occurrence of hemolysis, elevated liver enzyme levels (an increased plasma alanine aminotransferase concentration (>42 IU/L), or an increased plasma aspartate aminotransferase concentration (>42 IU/L) and thrombocytopenia (platelet count of less than  $100 \times 10^9/L$ ) or if there was a diagnosed IUGR with abnormal Doppler data (notch, no diastolic flow on umbilical artery or reverse flow in cerebral arteries).

Premature prolonged rupture of membranes (pPROM) group was defined as a delivery occurring after spontaneous preterm labor and PROM defined as leakage of amniotic fluid for more than 12h before delivery.

Preterm labor was defined if there is no obvious cause for delivery. Clinical chorioamnionitis was defined as a maternal temperature was greater than 37.8°C or fetal tachycardia greater than 180 bpm plus one of the following signs : maternal white blood count greater than 15,000 cells/mm<sup>3</sup>, uterine contraction, foul-smelling or stained amniotic fluid, maternal CRP >20mg/L.

Women who had features from both pPROM, clinical chorioamnionitis or vascular disease groups were attributed to the group that was considered determinant for preterm delivery.

#### Infant's data

Variables included: gestational age, sex, Apgar score, multiple pregnancy, administration of any corticosteroids to the mother, *in utero* transfer, and cesarean delivery before or during labor, lactates within 4 hours after birth, Clinical Risk Index for Babies (CRIB) score (1993) and platelet count at birth. The definition of small for gestational age (SGA) was based on birth weight according to Gardosi individualized growth curves for United Kingdom (Gardosi, Chang et al. 1992). The neonatal outcome variables included in-hospital mortality rate, bronchopulmonary dysplasia and the main morbidities of preterm infants. Early-onset proven infection was defined by a positive blood or cerebrospinal culture before 72 hours of postnatal age. Late-onset infection was defined after 72 hours of postnatal age by a CRP>10mg/l and abnormal clinical examination (at least one of those clinical signs: increasing apnea, feeding intolerance, abdominal distension, increased respiratory support, lethargy and hypotonia, temperature greater than 38 degrees C, hyperglycemia). Intraventricular hemorrhages were graded according to Papile's classification (Papile, Burstein et al. 1978). Stage of  $\geq 2$  of Bell's criteria were used for the diagnosis of Necrotizing enterocolitis (Bell, Ternberg et al. 1978). BPD at 36 weeks' corrected age was defined as persistent oxygen requirement or need for ventilatory support.

#### Neonatal protocols

Protocols remained unchanged throughout the study period regarding ventilator strategies (providing gentle ventilation : peak inspiratory pressure between 10 and 20 cmH<sub>2</sub>O, rates not to exceed 70 breaths per minute with permissive hypercapnia (45-65 mmHg) and early extubation), fluid intake, and PDA management. The use of HFO was chosen in rescue mode when despite invasive ventilation, persistent hypercarbia or hypoxia was observed or when there was documented pulmonary hemorrhage. Inhaled corticosteroids were used for very preterm infants with continuous assisted ventilation dependency to facilitate extubation (or prevent reintubation related to the severity of BPD)<sup>[MS2]</sup>. During the studied period no infant had received systemic corticosteroids therapy.

All preterm infants < 28 weeks of GA in our unit received systematic echocardiography for evaluation of PDA within 72 hours of life. Echocardiographic criterion for PDA treatment included evidence of left to-right shunt through the open duct on color Doppler scanning, ductus diameter >1.4 mm, increased left atrial diameter compared with aortic root (left atrium-to-aortic root ratio >1.4). Echocardiography was performed twice at least to confirm ductus closure. Surgery was performed on site if PDA remained hemodynamically significant after 2 courses of non steroidal anti-inflammatory drugs or if non steroidal anti-inflammatory drugs were contraindicated.

During the 5-year study period the most important changes in the management of preterm infants in our NICU included the alarm ranges of oxygen saturation: high alarm range: 88-98% from January 2005 to July 2006 and low alarm range: 84-94% from August 2006 to December 2009. Prophylaxis exogenous surfactant treatment (Curosurf; Chiesi, Parma, Italy) was administrated in extremely preterm infant <27 weeks GA from January 2005 to November 2005 and in extremely preterm infant <28 weeks of GA from December 2005 to December 2009. No other major change was performed in neonatal care during this period.

#### Placental histology



Placental histology was performed by three experienced pathologists who were unaware of the patient's history and evolution. Placentas were examined using a semiquantitative standardized method described by Benirschke (Benirschke 1962). Histological chorioamnionitis was diagnosed if neutrophil infiltrates were seen in the roof of the intervillous chamber and/or in the chorionic fetal plate, with or without location in the parietal membranes (Benirschke 1995). Funisitis was defined by the inflammatory involvement of the umbilical vein or arteries with or without migration of fetal neutrophil polymorphs into the Wharton's jelly (Lahra and Jeffery 2004).

### Statistical Analysis

We first compared vascular SGA and AGA extremely newborn for neonatal outcomes. The  $\chi^2$  or Fisher exact tests were used to compare categorical variables. For continuous outcomes, data were analyzed with t tests for normally distributed outcomes, and Wilcoxon rank sum test for non-normally distributed outcomes.

Then we developed unconditional logistic regression models by including both explanatory and potential confounding factors in a model if a hypothesis or evidence from previous studies existed to suggest that they were causally related to BPD. Potential confounding variables for the relationship between BPD and vascular IUGR were selected when a bivariate P value was  $< .10$ . Factors that are involved in the pathway between risk factors and the outcome were not included in the model to avoid overadjustment. ORs with 95% CIs were estimated using unconditional logistic regression analysis.

All analyses were carried out using SAS Version 9.1 software (Cary; NC, USA).

## RESULTS

Three hundred and nineteen infants were born between 2005 and 2009 at the Port Royal Maternity with a gestational age between 23 and 28 weeks. Among them, ninety infants were SGA, 52 of whom born to a mother with vascular disease (58%). One hundred and twenty preterm infants were excluded because they died in delivery room (n=6) or before 36 weeks of GA (n=57); because they had congenital malformation (n=17) or the gestational age was uncertain (n=2). One infant had to be transferred very early to another NICU. For 34 infants, mother's anthropometric data were missing, and thus the growth data were unavailable according Gardosi individualized curve.

Finally, data from 199 infants from 186 mothers were analyzed: 42 (21%) included in the SGA due to vascular disease group. Data for BPD status at 36 weeks of GA were available for 184 infants (40 in the SGA with vascular origin group). Placental histology was available for 171 of 184 infants (93%). There was no difference in BPD rate between patients treated by prophylactic surfactant or not and according to saturation target range (Table 1).

Maternal characteristics were not significantly different for age, ethnic origin, gravity or parity between groups (Table 2). Indications for delivery significantly differ between group. Cesarean section was performed for 98% of the SGA vascular group vs 35% for the AGA babies ( $p<0.0001$ ). Placental histology was concordant in 92% with the mother's clinical history of vascular disease.

Neonatal characteristics at birth comparing AGA and SGA are described in table 2. Gestational age at birth was higher in the SGA group. Markers of intrauterine hypoxia as lactates rate were significantly higher in the SGA group.

Other neonatal morbidities were not significantly different between SGA vascular group and AGA preterm infants whatever the cause of preterm birth was, except for thrombocytopenia

which occurred significantly more frequently in SGA vascular group (respectively 72% and 19%;  $p<0.0001$ ). (Table 4)

Bronchopulmonary dysplasia was significantly higher in the SGA with vascular origin group than in the AGA group (85% vs 52%;  $p=0.0001$ ) (Table 5).

In the studied population, identified risk factors for BPD are: vascular disease indication for delivery (as confirmed by placental histology) ( $p=0.0142$  and  $0.0214$  respectively); gestational age below 26 weeks' GA ( $p=0.0022$ ), lower birthweight (828 versus 955g;  $p=0.0001$ ), lower Apgar score (7.4 versus 8.7;  $p<0.0001$ ), higher lactates (5.2 vs 4.1 mmol/L;  $p=0.0166$ ), higher CRIB score (5.4 vs 3.1;  $p<0.0001$ ) and lower platelet count at birth (232 000 vs 274 000/mm<sup>3</sup>;  $p=0.0008$ ). Histological funiculitis was not associated with BPD. The number of endotracheal intubations (except those immediately after birth for surfactant prophylaxis), represent a risk factor for BPD as well as the duration of invasive ventilation longer than 7 days ( $p<0.0001$ ), necessity of using HFO ( $p<0.0001$ ), pulmonary hemorrhage ( $p=0.0437$ ), duration of nasal continuous positive airway pressure (35.4 d  $\pm$  9 vs 30.4 d  $\pm$  10.6;  $p=0.0006$ ) and inhaled corticosteroids ( $p<0.0001$ ). Other risk factors for BPD are patent ductus arteriosus ( $p=0.0045$ ) and especially those requiring surgery ( $p<0.0001$ ), need of hemodynamic support ( $p=0.0035$ ) and late-onset infection ( $p=0.0297$ ).

In a first model of multivariate analysis, gestational age (aOR: 0.64, 95% CI: 0.41-1), vascular IUGR (aOR: 5.23; 95% IC: 1.76-15.58) and duration of invasive ventilation longer than 7 days (aOR: 6.65; 95%IC: 3.07-14.39) were significantly associated with BPD at 36 weeks. The results of the second multivariate model are presented on table 5.

## DISCUSSION

The purpose of our study was to investigate the relationship between intra uterine growth restriction due to vascular antenatal condition and respiratory outcome. For the first time we used individualized growth curves designed by J. Gardosi (Gardosi, Chang et al. 1992). We found that, among infants born before 28 weeks of gestation, the SGA status due to a maternal vascular disease was associated with an increased need of ventilator support on day 28<sup>th</sup> and a higher rate of BPD at 36 weeks' GA. The association between vascular and BPD risk persisted after adjustment for already known confounding factors in the multivariate analysis.

Moreover, throughout the hospital's stay in the SGA infant group, we observed worsening respiratory parameters with longer duration of invasive ventilation and more endotracheal intubations required per infant. Paradoxically, it is well known that ventilator dependency is both a marker of the respiratory illness and a cause itself. Many studies, have shown mechanical ventilation of preterm animals without simultaneous exposure to high levels of supplemental oxygen results in the pathological lesion of BPD (Albertine, Jones et al. 1999, Coalson, Winter et al. 1999). The most frequent use of inhaled corticosteroids, twice more, in the vascular IUGR group ( $p=0.0054$ ), represents an indirect marker of the severity of respiratory illness. Only inhaled corticosteroids were used according to Cochrane database, in ventilated infants with BPD, for 1 to 4 weeks to improve the endotracheal extubation rate (Lister, Iles et al.). Noteworthy, no infant received general corticosteroids therapy in our study. Numerous studies, have previously shown the respiratory compromise of IUGR infants, but failed to demonstrate a link with the etiology of IUGR (Bardin, Zelkowitz et al. 1997, Gortner, Wauer et al. 1999, Reiss, Landmann et al. 2003, Aucott, Donohue et al. 2004, Garite, Clark et al. 2004). These studies are, however, difficult to compare because they are interested in newborns of very different gestational age. Only two studies had recently shown the

increase of BPD risk in IUGR infants born to mothers with vascular disease. Hansen et al. found that the odds ratio for the relationship between preeclampsia and BPD was 2.96 (IC=1.17 to 7.51) and 18.7 when controlling for clinical confounders (Hansen, Barnes et al. 2010). However they did not mention a well known confounding factor of BPD as PDA for example. Durrmeyer et al also found that severe growth restriction below the third percentile was associated with BPD (aOR, 9.18; 95% CI, 2.59-32.6) (Durrmeyer, Kayem et al. 2011). However, the study design was different and small for gestational age babies from other cause than maternal vascular disease were included in the control group (Durrmeyer, Kayem et al. 2011). Moreover neither Hansen, nor Durrmeyer mentioned the use of corticosteroids therapy in the studied population. Ogge et al. showed that the prevalence of placental lesions consistent with maternal underperfusion decreased gradually and continuously with gestational age in the preeclampsia group as high as 100% in the group of gestational age below 25 weeks of GA (despite a very low effective, n=2) to 70% for the group of gestational age between 27 and 28.9 weeks' GA (Ogge, Chaiworapongsa et al. 2011). In our study histological results of the placenta analysis were quite concordant with the clinical diagnosis of mother / infant vascular disease (33/35, 94%)..

Interestingly, low platelet count seems to be an indirect “risk factor” marker for BPD, supporting the “pathophysiological vascular hypothesis of BPD”. Tsao et al., studied 69 preterm infant of gestational age between 26 and 37 weeks born from preeclamptic mother (Tsao, Wei et al. 2005). They showed that infants with maternal preeclampsia had higher cord blood sFlt-1 but lower VEGF levels and that there was a significantly negative relationship between neonatal platelet count and cord blood sFlt-1 levels. Nowadays, much experimental evidence had shown the important role of VEGF in normal lung development. Withdrawal of VEGF disrupts alveolarization in rat pups (Thebaud, Ladha et al. 2005) otherwise exogenous VEGF restore normal lung development (Thebaud, Ladha et al. 2005). More recently, Tang showed

that injection of sFlt1 in amniotic fluid impairs lung growth of rat pups (Tang, Karumanchi et al. 2011). De Paepe et al., using micro array analysis, showed in postmortem lung samples from short-term ventilated preterm infants that among down-regulated genes proangiogenic vascular endothelial growth factor (VEGF)-B and one of its receptor had been found (De Paepe, Greco et al.). Moreover, one of anti-angiogenic factors involved in the pathogenesis of preeclampsia is sEng, a soluble receptor of TGF-beta which is expressed by fibroblasts and epithelial cells in lung during early gestation (Jobe and Bancalari 2001). In cultured fetal lung, TGF-beta inhibits branching and blocks differentiation of type II cells. (Jobe and Bancalari 2001). So even if BPD remains mainly explained by traditional risk factors, our study is quite concordant with the pathophysiological vascular hypothesis.

Our study although coming from a fairly homogeneous population in terms of supportive care, has several limitations because it is a retrospective, single-center and the stratification into 2 groups reduces statistical power. Nevertheless, BPD is a multifactorial disease and the ventilator strategies, as high pressure or high FiO<sub>2</sub> are known to play a key role in it (Jobe and Bancalari 2001).

In conclusion, placental underperfusion, as documented by placenta pathology, leads to maternal and fetal disease but also worsens neonatal outcome. The “vascular hypothesis” of the BPD is still valid, and question of the role of anti-angiogenic factors is renewed with as low platelet count could be an indirect marker of it. Moreover, this study is the first to use Gardosi’s individualized curves, taking into account only normal pregnancy data, on mid-term prognosis for extremely preterm infant and show their potential interest.

## REFERENCES

- (1993). "The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. The International Neonatal Network." Lancet **342**(8865): 193-198.
- Albertine, K. H., G. P. Jones, B. C. Starcher, J. F. Bohnsack, P. L. Davis, S. C. Cho, D. P. Carlton and R. D. Bland (1999). "Chronic lung injury in preterm lambs. Disordered respiratory tract development." Am J Respir Crit Care Med **159**(3): 945-958.
- Aucott, S. W., P. K. Donohue and F. J. Northington (2004). "Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction." J Perinatol **24**(7): 435-440.
- Bardin, C., P. Zolkowitz and A. Papageorgiou (1997). "Outcome of small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age infants born before 27 weeks of gestation." Pediatrics **100**(2): E4.
- Bell, M. J., J. L. Ternberg, R. D. Feigin, J. P. Keating, R. Marshall, L. Barton and T. Brotherton (1978). "Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging." Ann Surg **187**(1): 1-7.
- Benirschke, K. (1962). "A review of the pathologic anatomy of the human placenta." Am J Obstet Gynecol **84**: 1595-1622.
- Benirschke, K., Ed. (1995). Pathology of the human placenta. New York, Springer-Verlag.
- Coalson, J. J., V. T. Winter, T. Siler-Khodr and B. A. Yoder (1999). "Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons." Am J Respir Crit Care Med **160**(4): 1333-1346.
- De Paepe, M. E., D. Greco and Q. Mao "Angiogenesis-related gene expression profiling in ventilated preterm human lungs." Exp Lung Res **36**(7): 399-410.
- Durrmeyer, X., G. Kayem, M. Sinico, G. Dassieu, C. Danan and F. Decobert (2011). "Perinatal risk factors for bronchopulmonary dysplasia in extremely low gestational age infants: a pregnancy disorder-based approach." J Pediatr **160**(4): 578-583 e572.
- Ferdynus, C., C. Quantin, M. Abrahamowicz, R. Platt, A. Burguet, P. Sagot, C. Binquet and J. B. Gouyon (2009). "Can birth weight standards based on healthy populations improve the identification of small-for-gestational-age newborns at risk of adverse neonatal outcomes?" Pediatrics **123**(2): 723-730.
- Gardosi, J. (2009). "Intrauterine growth restriction: new standards for assessing adverse outcome." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **23**(6): 741-749.
- Gardosi, J., A. Chang, B. Kalyan, D. Sahota and E. M. Symonds (1992). "Customised antenatal growth charts." Lancet **339**(8788): 283-287.
- Garite, T. J., R. Clark and J. A. Thorp (2004). "Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates." Am J Obstet Gynecol **191**(2): 481-487.
- Gortner, L., R. R. Wauer, G. J. Stock, H. L. Reiter, I. Reiss, G. Jorch, R. Hentschel and G. Hieronimi (1999). "Neonatal outcome in small for gestational age infants: do they really better?" J Perinat Med **27**(6): 484-489.
- Hansen, A. R., C. M. Barnes, J. Folkman and T. F. McElrath (2010). "Maternal preeclampsia predicts the development of bronchopulmonary dysplasia." J Pediatr **156**(4): 532-536.
- Hertig, A. and P. Liere "New markers in preeclampsia." Clin Chim Acta **411**(21-22): 1591-1595.
- Jobe, A. H. and E. Bancalari (2001). "Bronchopulmonary dysplasia." Am J Respir Crit Care Med **163**(7): 1723-1729.
- Lahra, M. M. and H. E. Jeffery (2004). "A fetal response to chorioamnionitis is associated with early survival after preterm birth." Am J Obstet Gynecol **190**(1): 147-151.
- Lal, M. K., B. N. Manktelow, E. S. Draper and D. J. Field (2003). "Chronic lung disease of prematurity and intrauterine growth retardation: a population-based study." Pediatrics **111**(3): 483-487.
- Lister, P., R. Iles, B. Shaw and F. M. Ducharme "WITHDRAWN. Inhaled steroids for neonatal chronic lung disease." Cochrane Database Syst Rev(1): CD002311.
- Maynard, S. E., J. Y. Min, J. Merchan, K. H. Lim, J. Li, S. Mondal, T. A. Libermann, J. P. Morgan, F. W. Sellke, I. E. Stillman, F. H. Epstein, V. P. Sukhatme and S. A. Karumanchi (2003). "Excess placental

- soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest **111**(5): 649-658.
- Ogge, G., T. Chaiworapongsa, R. Romero, Y. Hussein, J. P. Kusanovic, L. Yeo, C. J. Kim and S. S. Hassan (2011). "Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia." J Perinat Med **39**(6): 641-652.
- Papile, L. A., J. Burstein, R. Burstein and H. Koffler (1978). "Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm." J Pediatr **92**(4): 529-534.
- Reiss, I., E. Landmann, M. Heckmann, B. Misselwitz and L. Gortner (2003). "Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age." Arch Gynecol Obstet **269**(1): 40-44.
- Resnik, R. (2007). "One size does not fit all." Am J Obstet Gynecol **197**(3): 221-222.
- Tang, J. R., S. A. Karumanchi, G. Seedorf, N. Markham and S. H. Abman (2011). "Excess soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in amniotic fluid impairs lung growth in rats: linking preeclampsia with bronchopulmonary dysplasia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(1): L36-46.
- Thebaud, B., F. Ladha, E. D. Michelakis, M. Sawicka, G. Thurston, F. Eaton, K. Hashimoto, G. Harry, A. Haromy, G. Korbutt and S. L. Archer (2005). "Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization." Circulation **112**(16): 2477-2486.
- Tsao, P. N., S. C. Wei, Y. N. Su, H. C. Chou, C. Y. Chen and W. S. Hsieh (2005). "Excess soluble fms-like tyrosine kinase 1 and low platelet counts in premature neonates of preeclamptic mothers." Pediatrics **116**(2): 468-472.
- Zeitlin, J., M. El Ayoubi, P. H. Jarreau, E. S. Draper, B. Blondel, W. Kunzel, M. Cuttini, M. Kaminski, L. Gortner, P. Van Reempts, L. Kollee and E. Papiernik (2010). "Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort." J Pediatr **157**(5): 733-739 e731.



Table 1: Antenatal materno-fetal characteristics according to growth parameters in ELBW infants

	BPD (n=109) n (%)	No BPD (n=75) n (%)	p value
Prophylactic surfactant			NS
- Yes	103 (61)	66 (39)	
- No	6 (40)	9 (60)	
Saturation target range			NS
- 88-98%	32 (59)	22 (41)	
- 84-94%	77 (59)	53 (41)	

Table 2: Antenatal materno-fetal characteristics according to growth parameters in ELBW infants

		AGA (n=144) n (%)	SGA with Vas- cular IUGR (n=40) n (%)	p value
Maternal age, years, mean (SD)		31.7 (5.6)	32.1 (6.8)	NS
Maternal ethnic group				NS
- Caucasian		60	16	
- North Africa		31	4	
- Sub saharian Africa		48	18	
- Asia		4	1	
Gravidy, mean (SD)		2.8 (1.8)	2.7 (2.2)	NS
Parity, mean (SD)		1.9 (1.1)	1.7 (1.1)	NS
Multiple gestation		42	3	0.0183
C section		51 (35)	39 (98)	<0.0001
Indication of delivery				<0.0001
- Vascular		6 (4)	35 (88)	
- Preterm labour		56 (39)	1 (3)	
- pPROM		36 (25)	0	
- Clinical chorioamnionitis		40 (28)	1 (3)	
- Others		6 (4)	3 (8)	
Placental histology				<0.0001
- Normal		32 (24)	2 (6)	
- Vascular		8 (6)	33 (92)	
- Chorioamnionitis		85 (63)	0	
- Vascular and chorioamnionitis		3 (2)	0	
- Other		7 (5)	1 (3)	
Funiculitis		47 (35)	0	<0.0001
Antenatal corticosteroids				NS
- No		3 (2)	0	
- Complete		114 (82)	32 (84)	
- Missing data		5	2	

AGA= adjusted for gestational age, SGA= small for gestational age, IUGR= intra-uterine growth restricted

Table 23: Neonatal characteristics at birth according growth parameters in ELBW infants

	AGA (n=144) n (%)	SGA with vascular IUGR (n=40) n (%)	p value
Gestational age (weeks)			0.001
- [24-26[	49 (34)	3 (8)	
- [26-28[	95 (66)	37 (93)	
Sex : boy	79 (55)	19 (48)	NS
Apgar score M5 mean (SD)	8.0 (2.2)	7.7 (2.2)	NS
Birthweight (g) mean (SD)	927.3 (149)	710 (95.6)	<0.0001
Lactates at birth (mmol/L) mean (SD)	4.3 (3)	6.8 (3.7)	<0.0001
CRIB score mean (SD)	3.8 (2.7)	6.3 (2.5)	<0.0001
Platelet count at birth( < 150 000 G/L)	7 (5)	13 (33)	<0.0001

CRIB= Clinical Risk Index for Babies

Table 34: Neonatal morbidity according to growth parameters in ELBW infants

	AGA (n=144) n (%)	SGA Vascular IUGR (n=40) n (%)	p value
Early- onset neonatal infection	1 (1)	0 (0)	NS
Late onset neonatal infection			NS
- No	61 (43)	11 (28)	
- 1	59 (42)	18 (45)	
- $\geq 2$	21 (15)	11 (28)	
Necrotizing enterocolitis	7 (5)	1 (3)	NS
Intraventricular hemorrhage			NS
- I-II	94(65)	23 (58)	
- III-IV	6 (4)	2 (5)	
Periventricular leukomalacia	1 (1)	2 (5)	
Patent ductus arteriosus (PDA)	96 (67)	31 (78)	NS
PDA requiring surgery	29 (30)	13 (42)	NS
Thrombocytopenia before 36weeks	28 (19)	25 (72)	<0.0001

PDA= Patent ductus arteriosus

Table 45: Neonatal respiratory outcome according to growth parameters in ELBW infants

	AGA (n=144) n (%)	SGA with vas- cular IUGR (n=40) n (%)	p value
Ventilator needs on day 28			0.0004
- Spontaneous breathing	20 (14)	1 (3)	
- Spontaneous breathing with supple- mental O <sub>2</sub>	3 (2)	1 (3)	
- CPAP on air	70 (49)	9 (23)	
- CPAP with O <sub>2</sub> supplementation	26 (18)	18 (45)	
- Invasive ventilation	25 (17)	11 (28)	
BPD at 36 weeks			0.0001
- No	69 (48)	6 (15)	
- Yes: mild	34 (23)	13 (32)	
- Yes: moderate	28 (19)	13 (32)	
- Yes: severe	9 (6)	7 (17)	
Number of endotracheal intubations before 36 weeks of gestation (except in DR)			NS
- 0	47 (33)	8 (20)	
- >2	18 (13)	10 (25)	
Duration of invasive ventilation before 36 weeks $\geq 7$ d	73 (51)	32 (80)	0.0004
Respiratory distress requiring HFO	26 (18)	15 (38)	0.0089
Pulmonary hemorrhage	3 (2)	7 (18)	0.0002
Duration of non invasive ventilation d (SD)	33.1 (10.1)	34.5 (9.6)	NS
Inhaled corticosteroids therapy			0.0054
- Never	120 (83)	25 (63)	
- Before 36 weeks	21 (15)	14 (35)	
- After 36 weeks	3 (2)	0	
- Before and after 36 weeks	0	1 (3)	

DR=delivery room, HFO:high frequency oscillator, CPAP= continuous positive airway pressure, BPD=Bronchopulmonary dysplasia

Table 56: Risk factors for BPD: multivariate analysis

	Multivariate analysis		
	OR	IC 95%	<i>p-value</i>
Birthweight (/100g)	0.730	0.568 – 0.937	<i>0.0137</i>
Platelet count at birth*	0.798	0.640 – 0.995	<i>0.0448</i>
Duration of invasive ventilation			<i>&lt;0.0001</i>
< 7 days	1.000		
> 7 days	7.284	3.443 – 15.414	

Platelet count had been encoded (platelet/50.000/mm<sup>3</sup>).

## Partie 4: discussion générale, résultats complémentaires, perspectives

---

### I-Choix des modèles : sélection du modèle restriction protidique

Les trois modèles de RCIU étudiés ont été choisis pour leur faisabilité et leur reproductibilité. En effet, ces modèles ont déjà été utilisés à plusieurs reprises et publiés par des équipes françaises. A ce jour, leur effet a été décrit dans différents organes :

- le modèle de ligature unilatérale de l'artère utérine provoque une diminution des pré-oligodendrocytes à P7 suivi par un retard de myélinisation même chez les ratons ayant un RCIU modéré. Une deuxième agression sur ce cerveau en développement, provoque chez les ratons atteints d'un RCIU sévère, une atteinte plus étendue que chez les témoins alors que chez les ratons porteurs d'un RCIU modéré la lésion est de moindre étendue par rapport aux témoins (Olivier, Baud et al. 2005) ;
- le modèle L-NAME, a été utilisé pour étudier le syndrome métabolique chez des rats à 3 et 9 mois. Aucune conséquence d'un traitement prénatal par le L-NAME n'a été démontrée (Butruille, Mayeur et al. 2013) ;
- le modèle de restriction protidique isocalorique, avec 9% de caséine versus 23% chez les témoins a été étudié dans le rein au 20<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire. L'analyse transcriptomique du génome à large échelle a montré la modification de 1800 transcrits. La voie la plus modifiée était celle de la cascade du complément et la voie de la coagulation (Buffat, Boubred et al. 2007). L'étude du placenta dans ce même modèle montre une diminution des transcrits impliqués dans la synthèse de protéines jouant un rôle dans l'immunité, la signalisation et la réponse aux agressions extérieures (Buffat, Mondon et al. 2007). L'analyse transcriptomique d'autres organes (foie, cœur, poumon) montre que les altérations de l'expression génique sont maximales dans les organes dont le fonctionnement débute tardivement pendant la vie intra-utérine comme le poumon (Vaiman, Gascoin-Lachambre et al. 2011). Les voies modifiées diffèrent singulièrement entre les différents organes montrant une adaptation tissu-spécifique

pour répondre aux modifications de l'environnement intra-utérin (Vaiman, Gascoin-Lachambre et al. 2011).

Les poumons des animaux de ces trois modèles ont donc été analysés en morphométrie. Les résultats de l'analyse des deux derniers modèles ont fait l'objet d'une première publication.

L'analyse de poumons du modèle « ligature de l'artère utérine » retrouve une morphométrie pulmonaire comparable entre les différents groupes étudiés c'est-à-dire :

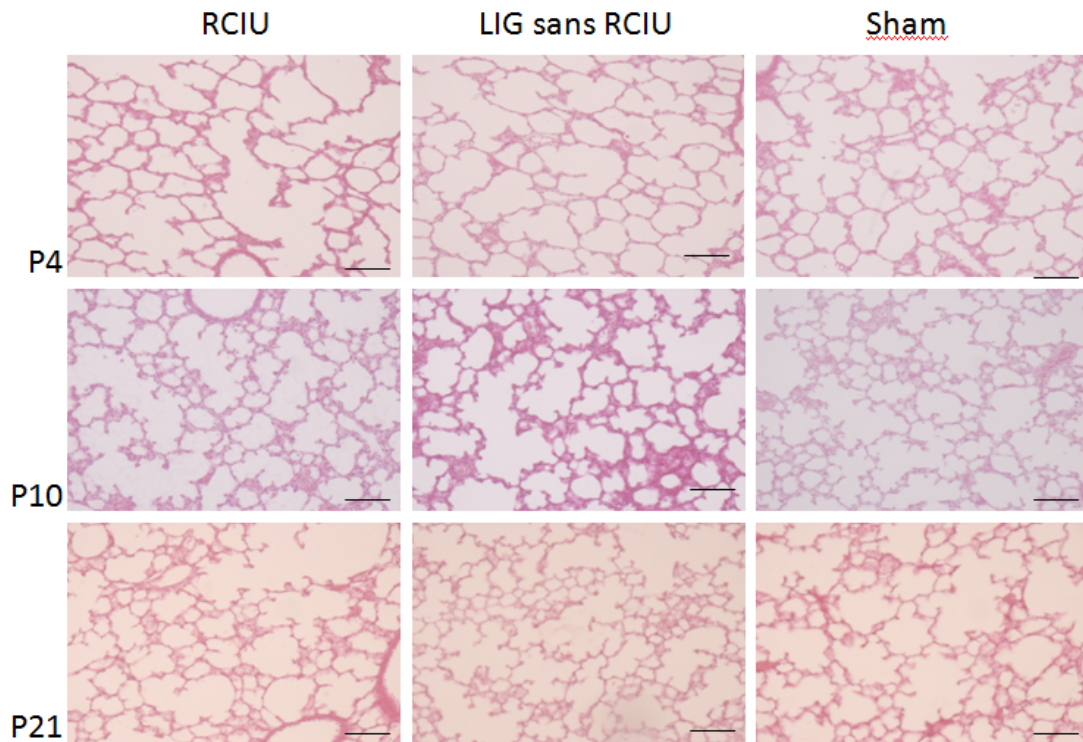
- le groupe « sham » : sédation-analgésie par hydrate de chloral de la rate gestante puis ouverture abdominale et fermeture
- le groupe « ligature » divisé lui-même en deux sous-groupes « RCIU » et « eutrophe »

Les résultats sont présentés dans le tableau 3 et la figure 1.

**TABEAU 3 :** ANALYSE MORPHOMETRIQUE DES RATONS AGES DE 4, 10 OU 21 JOURS DE VIE POST-NATALE DANS LE MODELE DE RCIU INDUIT PAR LIGATURE UNILATERALE DE L'ARTERE UTERINE. LES RESULTATS SONT PRESENTES EN MOYENNE  $\pm$  ECART-TYPE. \*  $P < 0,05$ .

<b>P4</b>	Vvp	Lm	Sva	Sv(a,p)	Sa
RCIU (n=5)	0,91 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01	48,39 $\pm$ 7.14	53,38 $\pm$ 7.18	25,46 $\pm$ 3.49
LIG sans RCIU (n=11)	0,95 $\pm$ 0.11	0,08 $\pm$ 0.01	52,36 $\pm$ 6.35	55,99 $\pm$ 6.51	33,47 $\pm$ 6.59
Sham (n=3)	0,94 $\pm$ 0.02	0,08 $\pm$ 0	53,38 $\pm$ 3.32	56,62 $\pm$ 4.8	39,67 $\pm$ 2.37
<b>P10</b>	Vvp	Lm	Sva	Sv(a,p)	Sa
RCIU (n=4)	0,92 $\pm$ 0.02	0,07 $\pm$ 0	54,96 $\pm$ 2.41	59,72 $\pm$ 3.74	60,82 $\pm$ 1.98
LIG sans RCIU (n=9)	0,92 $\pm$ 0.02	0,07 $\pm$ 0.01	55,05 $\pm$ 7.25	59,79 $\pm$ 7.89	72,41 $\pm$ 8.85
Sham (n=3)	0,93 $\pm$ 0.02	0,08 $\pm$ 0.01	51,46 $\pm$ 4.69	55,11 $\pm$ 3.92	77,46 $\pm$ 4.8
<b>P21</b>	Vvp	Lm	Sva	Sv(a,p)	Sa
RCIU (n= 3)	0,97 $\pm$ 0.01	0,08 $\pm$ 0.01	53,38 $\pm$ 7.33	55,05 $\pm$ 7.87	107,41 $\pm$ 9.53
LIG sans RCIU (n=4)	0,98 $\pm$ 0.02	0,09 $\pm$ 0.02	47,44 $\pm$ 8.65	48,60 $\pm$ 8.56	100,45 $\pm$ 11.72
Sham (n=7)	1,02 $\pm$ 0.17	0,06 $\pm$ 0.01	63,70 $\pm$ 7.53	63,63 $\pm$ 12.25	113,21 $\pm$ 28.81

**Figure 1** : Coupes histologiques des poumons dans le modèle « ligature unilatérale de l'artère utérine » à P4, P10 et P21. Grossissement x20.



## II- Absence de modification des facteurs de croissance impliqués dans le développement pulmonaire post-natal

Historiquement, les facteurs impliqués dans le développement pulmonaire ont été étudiés dans des modèles d'anomalies de l'alvéolisation induits en post-natal par l'hyperoxie, la ventilation mécanique ou l'injection de lipopolysaccharide ou sur des modèles de KO inducible ou par inhibition spécifique de certains récepteurs. En revanche, les conséquences d'agression anté- ou postnatales ont été peu étudiées comme facteur induisant une cascade de conséquences sur l'ensemble des facteurs connus de développement alvéolaire. Seules deux études ont été conduites dans ce sens.

McAdams *et al* ont étudié l'effet de l'injection intra-amniotique de streptocoque du groupe B chez des macaques. Cette étude a montré des anomalies du développement alvéolaire. L'analyse en microarray montre que seule l'expression de MMP2 et de l'angiopoïétine, parmi les facteurs précédemment décrits, sont modifiées de façon significative (McAdams,



Vanderhoeven et al. 2012). Les voies modifiées sont celles de l'inflammation, de la vasculogénèse et de l'angiogénèse ainsi que celles de la morphogénèse et du développement cellulaire dont celle du développement musculaire cardiaque.

L'analyse par microarray de poumons de grands prématurés ventilés quelques jours seulement retrouve une augmentation de l'expression de transcrits de gènes dits « angiostatiques » et la diminution de l'expression de transcrits de gènes pro-angiogéniques comme le VEGF et son récepteur le VEGFR-2 et le récepteur de l'angiopoiétine Tie2. Aucun autre facteur décrit n'était modifié. Cependant cette analyse ne comporte que 6 patients : 3 patients, ventilés de 3 à 6 jours et 3 contrôles ventilés moins d'une heure (De Paepe, Greco et al. 2010).

Ces dernières études suggèrent qu'il existe d'autres mécanismes de régulation qui contrôlent l'alvéolisation. En effet, l'alvéolisation implique des phénomènes complexes qui requièrent une croissance coordonnée de cellules épithéliales, une augmentation des réseaux capillaires et la présence de fibroblastes ainsi que leur différenciation.

Dans d'autres organes comme le rein, en cas de RCIU par restriction protidique anténatale, l'étude par puces d'expression à ARN ne retrouve pas de modification des facteurs de croissance impliqués dans le développement rénal (Buffat, Boubred et al. 2007).

Alors que les gènes décrits pour être impliqués dans l'alvéolisation ne sont pas modifiés dans le modèle « restriction protidique » à P4, P10 ou P21, l'expression de certains d'entre eux est diminuée dans le poumon total au 20<sup>ème</sup> jour de vie embryonnaire : MMP14 (0,5), FGFR3 (0,41), VEGF (0,54). Ceci est en faveur d'une programmation anténatale des anomalies de l'alvéolisation. De façon intéressante, une des voies de signalisation dont les transcrits sont diminués massivement est celle du VEGF passant par la voie de VEGFR-2.

### III- Etude des variations de la voie PPAR au cours du développement alvéolaire en cas de RCIU induit par restriction protidique

Notre étude montre que trois voies sont modifiées aux trois stades de développement étudiés : celle de l'adhésion cellulaire, celle des molécules et antigènes d'adhésion et enfin la voie des PPAR.

La voie PPAR est modifiée tant pour les régulateurs positifs (FABP4 à P4 et P10) que pour les cibles (FABP3, Adiponectine). C'est pourquoi nous allons la développer ici. A ce jour, la voie PPAR a été étudiée dans le poumon en développement surtout par l'équipe de Rehan et Torday. C'est principalement PPAR $\gamma$  qui a été étudié pour son rôle clé.

### *1) PPAR : généralités*

Les PPARs sont des récepteurs nucléaires et appartiennent à la famille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes, stéroïdes et rétinoïdes. Ils sont activés par des lipides. Il existe plusieurs isoformes décrites :  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$  qui jouent des rôles très différents. Les PPARs contrôlent l'homéostasie énergétique et sont d'importants régulateurs de l'adipogenèse (catabolisme via la bêta oxydation et le stockage) du métabolisme lipidique, de la réponse inflammatoire et de l'hématopoïèse

Les PPARs régulent l'expression génique en se liant à des séquences d'ADN spécifiques, appelées PPREs dans la région promotrice des gènes cibles. Avant de se lier à ses gènes cibles, les PPAR forment un hétérodimère avec le récepteur X aux rétinoïdes (RXR). Un nombre important de ligands endogènes ont été identifiés pour chaque isoforme PPAR incluant des acides gras à longue chaîne, des acides gras poly-insaturés comme l'acide linoléique et l'acide arachidonique, des acides gras saturés et des eicosanoïdes. De nombreux agonistes et antagonistes des PPARs ont été mis au point.

**TABLEAU 4 :** TRANSCRITS DE LA VOIE DE SIGNALISATION PPAR DONT L'EXPRESSION EST MODIFIEE AUX DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT ALVEOLAIRES ETUDIES DANS LE POUMON DANS NOTRE ETUDE

P4		P10		P21	
Augmentés	Diminués	Augmentés	Diminués	Augmentés	Diminués
FABP3		Adiponectine		FABP3	Adiponectine
		Aquaporine 7		Apolipoprotein C-III	Carnitine palmitoyl transferase 1b
		Acyl coA synthetase		Aquaporine7	FABP4
		FABP4		Cytochrome P450 family 27 subfamily a polypeptide 1	Similar to stearoyl-coenzyme A
		PPAR $\alpha$			Solute carrier family 27 (fatty acid transporter)
		Phosphoenolpyruvate-carboxykinase 1			Uncoupling protein1
		Uncoupling protein1			

## 2) PPAR et poumon

Le modèle paracrine de croissance utilisé pour étudier la maturation du système du surfactant et l'apparition d'une DBP montre la différenciation de lipo- en myofibroblastes et inversement, de façon physiologique ou secondaire à une exposition à l'hyperoxie, à un volotraumatisme ou à une infection. PPAR $\gamma$  joue un rôle central dans ce dialogue inter-cellulaire. C'est à ce jour, le rôle de PPAR $\gamma$  qui est le mieux connu dans le poumon. C'est l'équipe de J Torday qui a contribué principalement à avancer dans la compréhension des mécanismes.

Ils ont montré notamment que les fibroblastes remplis de vacuoles lipidiques présents à la base des septas alvéolaires dénommés lipofibroblastes avaient comme vocation de fournir aux pneumocytes de type II des lipides afin qu'ils synthétisent du surfactant sous contrôle de la leptine. Les lipofibroblastes sont des cellules uniques situées à la base des crêtes secondaires et qui subissent des altérations phénotypiques durant le développement pulmonaire impliquant: prolifération, perte des gouttelettes lipidiques et expression transitoire d'élastine.

En l'absence de PTHrP, les lipofibroblastes se différencient en myofibroblastes, cellules responsables de l'apparition d'une fibrose. Contrairement aux lipofibroblastes, les myofibroblastes ne permettent pas la croissance et la différenciation des pneumocytes de type II.

Des agonistes des PPARs, le prostanoïde 5,8,11,14-eicosatétraynoïque acide (ETYA) : agoniste mixte de PPAR  $\alpha$  et de PPAR $\gamma$  et le 15-deoxy-D-12,14- prostaglandine (PG) J2 (15-dPGJ2) : agoniste exclusif de PPAR $\gamma$  ont été administrés à des fibroblastes pulmonaires en culture, issus de rats âgés de 8 jours. Les agonistes provoquent une diminution de la synthèse d'ARNm de la tropo-élastine de façon dose-dépendante ainsi que la quantité de protéines de tropo-élastine. En parallèle le nombre de transcrits d'élastine est significativement diminué dans les fibroblastes traités par chaque agoniste (McGowan, Jackson et al. 1997). Ceci traduit le fait qu'en présence d'agonistes de PPAR $\gamma$ , les myofibroblastes retrouvent un phénotype de lipofibroblastes et peuvent à nouveau promouvoir la différenciation et la croissance des pneumocytes de type II (Rehan and Torday 2012).

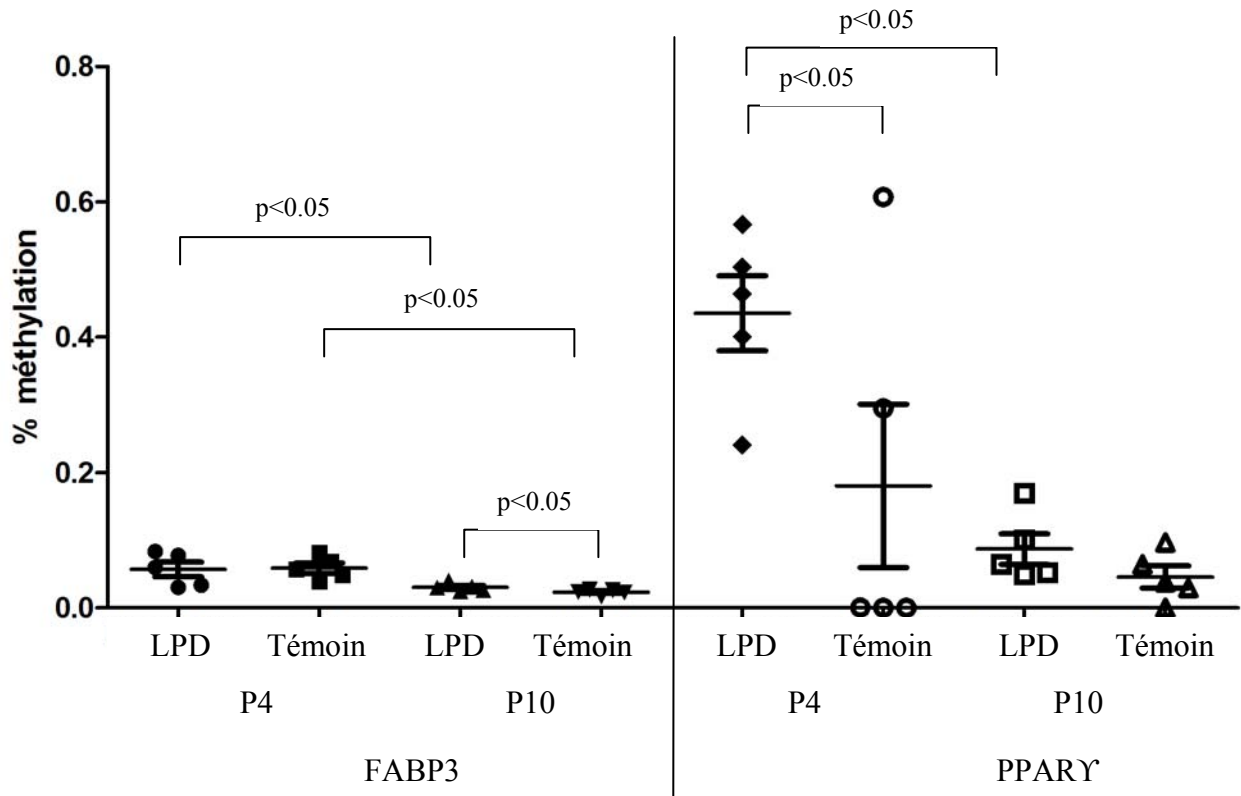
Dans un modèle d'inhibition du développement pulmonaire par la nicotine anténatale, l'administration d'agonistes de PPAR $\gamma$  annule les effets néfastes de la nicotine (Rehan and Torday 2012). L'administration de curcumine, agoniste naturel de PPAR $\gamma$ , à la dose de 5mg/kg/jour par voie intra-péritonéale a montré chez des rats exposés à l'hyperoxie une augmentation significative de l'alvéolisation (Sakurai, Villarreal et al. 2013) par rapport aux rats exposés à l'hyperoxie seule.

Dans un modèle de RCIU induit par une ligature bilatérale de l'artère utérine, Joss-Moore montre une diminution du niveau d'expression de PPAR $\gamma$  dans les poumons des rats.. Le traitement par l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras de type  $\omega$ 3, activateur de PPAR $\gamma$ , réduit cet effet. Cependant, dans ce modèle il n'existe pas de trouble de l'alvéolisation rendant difficile l'évaluation du bénéfice réel de ce traitement (Joss-Moore, Wang et al.).

Dans des expériences précédentes dans le même modèle de restriction protidique anténatale, l'étude des poumons de fœtus de rats au vingtième jour de vie embryonnaire, l'expression des ARNm de PPAR $\gamma$  est diminuée de façon significative (2,2) (Vaiman, Gascoin-Lachambre et al. 2011). Dans ce cadre, nos résultats posent la question d'une programmation anténatale des troubles de l'alvéolisation, commençant pendant la vie fœtale et du rôle des variations de l'expression de PPAR aux différents stades du développement pulmonaire que ce soit pendant la vie fœtale ou pendant l'alvéolisation en période post-natale.

Pour compléter cet aspect de la question, nous avons réalisé une étude épigénétique complémentaire à partir de l'ADN génomique extrait des poumons de rats à P4 et P10 afin d'étudier la méthylation de PPAR $\gamma$ . Il existe une diminution globale de la méthylation entre P4 et P10 chez les animaux RCIU et les contrôles (Figure 2). On observe également que le promoteur de PPAR $\gamma$  est plus méthylé à P4 chez les animaux RCIU par rapport aux contrôles témoignant d'une probable diminution programmée de l'expression de PPAR $\gamma$  à P4.

Le niveau de méthylation diminue également pour le promoteur de FABP3 entre P4 et P10 mais reste plus élevé à P10 chez les RCIU par rapport aux animaux contrôles.

**Figure2:** Méthylation des promoteurs des gènes FABP3 et PPARY à P4 et P10

Dans un modèle inflammatoire de DBP induit par une naissance prématurée, une ventilation mécanique et une exposition à l'oxygène, le contenu en FABP4 des macrophages dans les lavages broncho-alvéolaires est augmenté en cas de DBP (Ghelfi, Karaaslan et al. 2011). De même, les taux de FABP4 dans les sécrétions trachéales sont plus élevés en cas de DBP. En immunohistochimie, en cas de DBP, la densité des vaisseaux exprimant FABP4 est plus élevée que chez les témoins. Mais, ce sont surtout les vaisseaux péribronchiques qui sont concernés ; les capillaires alvéolaires expriment quant à eux faiblement FABP4. Cette molécule serait pro-angiogénique et appartient à la voie du VEGF (Ghelfi 2013).

L'adiponectine a été liée de nombreuses fois à la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) qui partage de nombreux mécanismes communs avec la DBP (Bourbon, Boucherat et al. 2009). Elle est exprimée dans les cellules épithéliales pulmonaires (Miller, Cho et al. 2009) et les souris ayant un déficit en adiponectine induit par KO sélectif ont une diminution de leur alvéolisation en période post-natale (6 jours, 18 jours) persistant à l'âge de 3 mois (Summer, Little et al. 2008). L'adiponectine module le processus de remodelage vasculaire en affectant directement le phénotype des cellules musculaires lisses. Son rôle ainsi que son ontogénie n'ont pas été étudié à ce jour dans la DBP.

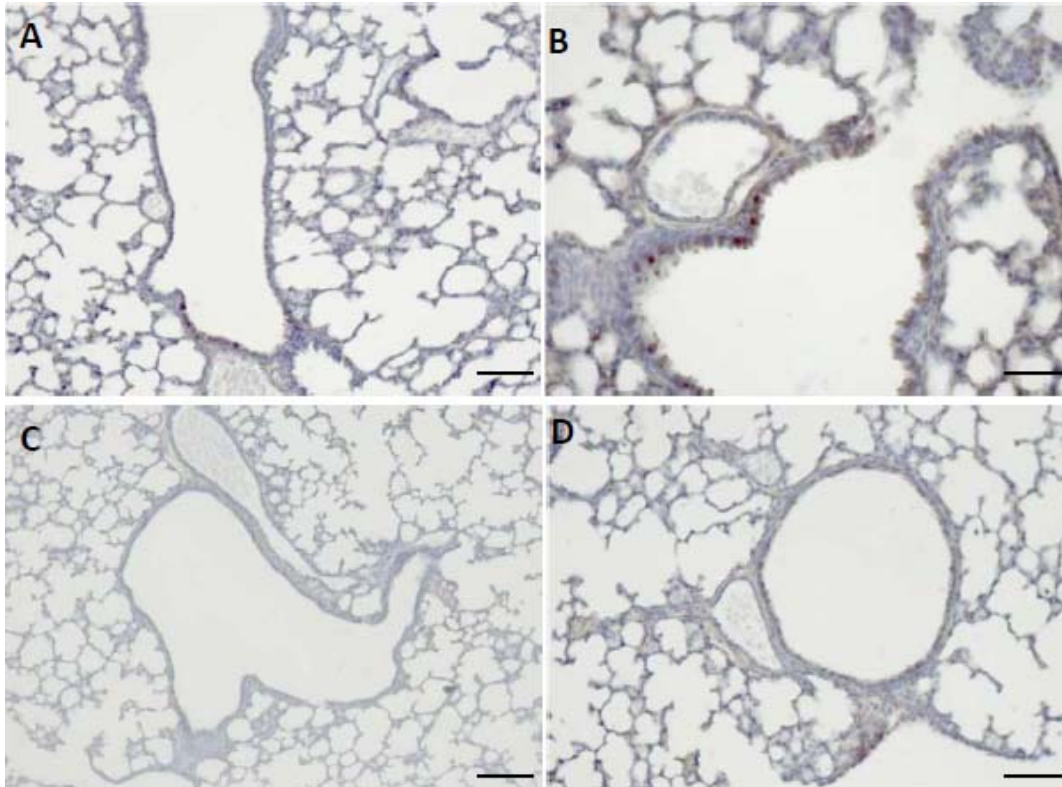
3) Quel rôle spécifique pour PPAR $\alpha$  dans le poumon ?

PPAR $\alpha$  est l'isoforme la plus décrite des PPAR. C'est l'isoforme prédominante au niveau pulmonaire pendant la vie fœtale PPAR $\alpha$ . Son taux est cependant physiologiquement plus bas dans le poumon fœtal que dans le poumon adulte (Abbott, Wood et al. 2010). A ce jour, l'effet d'agonistes / antagonistes de PPAR $\alpha$  seuls n'a pas été étudié dans le poumon ni le développement pulmonaire des souris KO pour PPAR $\alpha$ . Le seul argument indirect dont nous disposons est l'étude des poumons de rats à P0 et P21 dont les mères ont ingéré pendant toute la gestation du perfluorooctane sulfonate (PFOS), toxique connu pour activer la voie de PPAR $\alpha$ . L'analyse histologique montre à P0 et P21 une hémorragie alvéolaire avec un épaississement des septas inter-alvéolaires, accompagnés d'un infiltrat inflammatoire. Il existe par ailleurs une augmentation significative des phénomènes apoptotiques dans les septas alvéolaires à P0 et à P21 par rapport aux témoins (Chen, Zhang et al. 2012). L'étude morphométrique n'a pas été réalisée.

Dans les autres organes, l'effet d'un régime hypoprotidique anténatal a été étudié dans le cœur en période néonatale immédiate (P0) et à l'âge adulte (P105). L'expression de PPAR $\alpha$  est significativement augmentée à P105 dans les cœurs de rats adultes mais n'est pas modifiée en période néonatale traduisant une augmentation de la capacité de production énergétique à partir des acides gras. Il existe également une diminution de la méthylation du promoteur de PPAR $\alpha$  à la fois dans les cœurs de rats adultes et de rats nouveau-nés traduisant une induction développementale programmée (Slater-Jefferies, Lillycrop et al. 2011).

Dans notre étude, l'analyse en immunohistochimie des poumons de rats RCIU ou non est peu contributive en raison du caractère ubiquitaire de PPAR $\alpha$ . Il semble cependant que le signal induit par PPAR $\alpha$  soit plus important chez les animaux RCIU à P10 avec une localisation bronchique et veineuse péri-bronchique (Figure 3). Il est cependant difficile d'en tirer une quelconque conclusion.

**Figure 3:** Immunohistochimie PPAR $\alpha$  sur poumons à P10. A et B : poumons d'animaux RCIU. C et D : poumons d'animaux témoins.



Les mécanismes pouvant expliquer un rôle négatif de PPAR $\alpha$  sur le développement pulmonaire sont multiples, les plus importants pourraient être:

- rôle anti-inflammatoire avec inhibition de NF- $\kappa$ B. Or ce médiateur est essentiel au développement pulmonaire normal. Le blocage de NF- $\kappa$ B par un inhibiteur pharmacologique spécifique : BAY 11-7082 chez des souris âgées de 6 jours inhibe l'alvéolisation pulmonaire et l'angiogenèse (iosef, AJP lung, 2011)
- rôle antiangiogénique : le traitement de cellules endothéliales par du fénofibrate, inhibiteur sélectif de PPAR $\alpha$  inhibe la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur migration, inhibe la formation des tubes capillaires et inhibe l'angiogenèse *in vivo* (Varet, Vincent et al. 2003). Le fénofibrate agit en désorganisant les protéines du cytosquelette et notamment en jouant sur la dépolymérisation de l'actine (Varet, Vincent et al. 2003).



## Conclusion

---

Alors que le lien entre DBP et RCIU est bien établi sur le plan clinique, la physiopathologie reste mal comprise avec des résultats très discordants entre les modèles publiés à ce jour. Notre travail a confirmé cette discordance. Cependant, nous avons identifié un modèle facilement reproductible de RCIU responsable de troubles de l'alvéolisation prolongés évocateurs de ceux observés dans la DBP chez l'Homme : la restriction protidique à 9% *per* gestationnelle.

Les troubles de l'alvéolisation secondaires à un RCIU sont probablement très différents de ceux induits par une infection anténatale ou des agressions post-natales comme une exposition prolongée à l'hyperoxie puisqu'aucun de facteurs précédemment décrits dans le développement pulmonaire n'est modifié par rapport aux témoins que ce soit avant, pendant ou à la fin de l'alvéolisation et ce dans les deux modèles où une étude du transcriptome a été réalisée. Il existe à l'évidence un « programming » pulmonaire fœtal dont les mécanismes restent à élucider.

L'étude du génome à large échelle grâce à des puces d'expression à ARN, avant, pendant et après l'alvéolisation montre la perturbation de voies de l'immunité et de l'adhésion cellulaire, de protéines impliquées dans la contraction musculaire. La voie modifiée aux trois temps est celle du « peroxisome proliferator activated receptor » (PPAR). Cette voie est notamment intéressante car elle ouvre plusieurs options thérapeutiques et mérite d'être explorée plus largement notamment chez l'Homme.

## Bibliographie

- (1993). "The CRIB (clinical risk index for babies) score: a tool for assessing initial neonatal risk and comparing performance of neonatal intensive care units. The International Neonatal Network." Lancet **342**(8865): 193-198.
- Abbott, B. D., C. R. Wood, A. M. Watkins, K. P. Das and C. S. Lau (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha, Beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissues." PPAR Res **2010**.
- Ahmad, S. and A. Ahmed (2004). "Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia." Circ Res **95**(9): 884-891.
- Alejandre-Alcazar, M. A., M. Michiels-Corsten, A. G. Vicencio, I. Reiss, J. Ryu, R. R. de Krijger, G. G. Haddad, D. Tibboel, W. Seeger, O. Eickelberg and R. E. Morty (2008). "TGF-beta signaling is dynamically regulated during the alveolarization of rodent and human lungs." Dev Dyn **237**(1): 259-269.
- Alejandre Alcazar, M. A., R. E. Morty, L. Lendzian, C. Vohlen, I. Oestreicher, C. Plank, H. Schneider and J. Dotsch (2011). "Inhibition of TGF-beta signaling and decreased apoptosis in IUGR-associated lung disease in rats." PLoS One **6**(10): e26371.
- Alejandre Alcazar, M. A., I. Oestreicher, S. Appel, E. Rother, C. Vohlen, C. Plank and J. Dotsch "Developmental regulation of inflammatory cytokine-mediated Stat3 signaling: the missing link between intrauterine growth restriction and pulmonary dysfunction?" J Mol Med (Berl) **90**(8): 945-957.
- Alexander, G. R., J. H. Himes, R. B. Kaufman, J. Mor and M. Kogan (1996). "A United States national reference for fetal growth." Obstet Gynecol **87**(2): 163-168.
- Arden, M. G. and I. Y. Adamson (1992). "Collagen degradation during postnatal lung growth in rats." Pediatr Pulmonol **14**(2): 95-101.
- Atkinson, J. J., K. Holmbeck, S. Yamada, H. Birkedal-Hansen, W. C. Parks and R. M. Senior (2005). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase is required for normal alveolar development." Dev Dyn **232**(4): 1079-1090.
- Aucott, S. W., P. K. Donohue and F. J. Northington (2004). "Increased morbidity in severe early intrauterine growth restriction." J Perinatol **24**(7): 435-440.
- Bahtiyar, M. O., C. Buhimschi, V. Ravishankar, J. Copel, E. Norwitz, S. Julien, S. Guller and I. A. Buhimschi (2007). "Contrasting effects of chronic hypoxia and nitric oxide synthase inhibition on circulating angiogenic factors in a rat model of growth restriction." Am J Obstet Gynecol **196**(1): 72 e71-76.
- Balasubramaniam, V., A. M. Maxey, D. B. Morgan, N. E. Markham and S. H. Abman (2006). "Inhaled NO restores lung structure in eNOS-deficient mice recovering from neonatal hypoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(1): L119-127.
- Bardin, C., P. Zekowitz and A. Papageorgiou (1997). "Outcome of small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age infants born before 27 weeks of gestation." Pediatrics **100**(2): E4.
- Barker, D. J., J. G. Eriksson, T. Forsen and C. Osmond (2002). "Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis." Int J Epidemiol **31**(6): 1235-1239.
- Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh and M. E. Wadsworth (1989). "Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease." Bmj **298**(6673): 564-567.
- Bartels, D. B., L. Kreienbrock, O. Dammann, P. Wenzlaff and C. F. Poets (2005). "Population based study on the outcome of small for gestational age newborns." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **90**(1): F53-59.

- Bell, M. J., J. L. Ternberg, R. D. Feigin, J. P. Keating, R. Marshall, L. Barton and T. Brotherton (1978). "Neonatal necrotizing enterocolitis. Therapeutic decisions based upon clinical staging." Ann Surg **187**(1): 1-7.
- Benirschke, K. (1962). "A review of the pathologic anatomy of the human placenta." Am J Obstet Gynecol **84**: 1595-1622.
- Benirschke, K., Ed. (1995). Pathology of the human placenta. New York, Springer-Verlag.
- Bhandari, V. and J. R. Gruen (2006). "The genetics of bronchopulmonary dysplasia." Semin Perinatol **30**(4): 185-191.
- Bonikos, D. S., K. G. Bensch and W. H. Northway, Jr. (1976). "Oxygen toxicity in the newborn. The effect of chronic continuous 100 percent oxygen exposure on the lungs of newborn mice." Am J Pathol **85**(3): 623-650.
- Bonniaud, P., M. Kolb, T. Galt, J. Robertson, C. Robbins, M. Stampfli, C. Lavery, P. J. Margetts, A. B. Roberts and J. Gauldie (2004). "Smad3 null mice develop airspace enlargement and are resistant to TGF-beta-mediated pulmonary fibrosis." J Immunol **173**(3): 2099-2108.
- Bostrom, H., K. Willetts, M. Pekny, P. Leveen, P. Lindahl, H. Hedstrand, M. Pekna, M. Hellstrom, S. Gebre-Medhin, M. Schalling, M. Nilsson, S. Kurland, J. Tornell, J. K. Heath and C. Betsholtz (1996). "PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis." Cell **85**(6): 863-873.
- Boucherat, O., M. L. Franco-Montoya, C. Thibault, R. Incitti, B. Chailley-Heu, C. Delacourt and J. R. Bourbon (2007). "Gene expression profiling in lung fibroblasts reveals new players in alveolarization." Physiol Genomics **32**(1): 128-141.
- Bourbon, J., O. Boucherat, B. Chailley-Heu and C. Delacourt (2005). "Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia." Pediatr Res **57**(5 Pt 2): 38R-46R.
- Bourbon, J. R., O. Boucherat, J. Boczkowski, B. Crestani and C. Delacourt (2009). "Bronchopulmonary dysplasia and emphysema: in search of common therapeutic targets." Trends Mol Med **15**(4): 169-179.
- Bron C, B. P. (2007). "Morphologie et morphométrie du poumon humain." Encyclopédie Médico-Chirurgicale **6-000-A-10**: 13.
- Buckley, S. and D. Warburton (2002). "Dynamics of metalloproteinase-2 and -9, TGF-beta, and uPA activities during normoxic vs. hyperoxic alveolarization." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(4): L747-754.
- Buczynski, B. W., E. T. Maduekwe and M. A. O'Reilly (2013). "The role of hyperoxia in the pathogenesis of experimental BPD." Semin Perinatol **37**(2): 69-78.
- Buffat, C., F. Boubred, F. Mondon, S. T. Chelbi, J. M. Feuerstein, M. Lelievre-Pegorier, D. Vaiman and U. Simeoni (2007). "Kidney gene expression analysis in a rat model of intrauterine growth restriction reveals massive alterations of coagulation genes." Endocrinology **148**(11): 5549-5557.
- Buffat, C., F. Mondon, V. Rigourd, F. Boubred, B. Bessieres, L. Fayol, J. M. Feuerstein, M. Gannerre, H. Jammes, R. Rebourcet, F. Miralles, B. Courbieres, A. Basire, F. Dignat-Georges, B. Carbonne, U. Simeoni and D. Vaiman (2007). "A hierarchical analysis of transcriptome alterations in intrauterine growth restriction (IUGR) reveals common pathophysiological pathways in mammals." J Pathol **213**(3): 337-346.
- Burri, P. H. (2006). "Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth." Biol Neonate **89**(4): 313-322.
- Butruille, L., S. Mayeur, E. Moitrot, L. Storme, C. Knauf, J. Lesage and P. Deruelle (2013). "Maternal hypertension induced by NO blockade does not program adult metabolic diseases in growth-restricted rat fetuses." Metabolism.
- Canoy, D., J. Pekkanen, P. Elliott, A. Pouta, J. Laitinen, A. L. Hartikainen, P. Zitting, S. Patel, M. P. Little and M. R. Jarvelin (2007). "Early growth and adult respiratory function in men and women followed from the fetal period to adulthood." Thorax **62**(5): 396-402.
- Cardoso, W. V., A. Itoh, H. Nogawa, I. Mason and J. S. Brody (1997). "FGF-1 and FGF-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium." Dev Dyn **208**(3): 398-405.

- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeijt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoek, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau and A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-439.
- Carr, R., P. Brocklehurst, C. J. Dore and N. Modi (2009). "Granulocyte-macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial." Lancet **373**(9659): 226-233.
- Casella, I., T. Feccia, C. Chelucci, P. Samoggia, G. Castelli, R. Guerriero, I. Parolini, E. Petrucci, E. Pelosi, O. Morsilli, M. Gabbianelli, U. Testa and C. Peschle (2003). "Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor." Blood **101**(4): 1316-1323.
- Chailley-Heu, B., O. Boucherat, A. M. Barlier-Mur and J. R. Bourbon (2005). "FGF-18 is upregulated in the postnatal rat lung and enhances elastogenesis in myofibroblasts." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(1): L43-51.
- Chambers, H. M. and D. van Velzen (1989). "Ventilator-related pathology in the extremely immature lung." Pathology **21**(2): 79-83.
- Chelly, N., O. B. Mouhieddine-Gueddiche, A. M. Barlier-Mur, B. Chailley-Heu and J. R. Bourbon (1999). "Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(3): 423-432.
- Chen, H., L. Chang, H. Liu, Z. Rong, H. Zhu, Q. Zhang and W. Li (2004). "Effect of retinoic acid on platelet-derived growth factor and lung development in newborn rats." J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci **24**(3): 226-228.
- Chen, H., F. Zhuang, Y. H. Liu, B. Xu, P. Del Moral, W. Deng, Y. Chai, M. Kolb, J. Gaudie, D. Warburton, H. L. Moses and W. Shi (2008). "TGF-beta receptor II in epithelia versus mesenchyme plays distinct roles in the developing lung." Eur Respir J **32**(2): 285-295.
- Chen, T., L. Zhang, J. Q. Yue, Z. Q. Lv, W. Xia, Y. J. Wan, Y. Y. Li and S. Q. Xu (2012). "Prenatal PFOS exposure induces oxidative stress and apoptosis in the lung of rat off-spring." Reprod Toxicol **33**(4): 538-545.
- Clark, D. E., S. K. Smith, Y. He, K. A. Day, D. R. Licence, A. N. Corps, R. Lammoglia and D. S. Charnock-Jones (1998). "A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation." Biol Reprod **59**(6): 1540-1548.
- Coalson, J. J., V. Winter and R. A. deLemos (1995). "Decreased alveolarization in baboon survivors with bronchopulmonary dysplasia." Am J Respir Crit Care Med **152**(2): 640-646.
- Coalson, J. J., V. T. Winter, T. Siler-Khodr and B. A. Yoder (1999). "Neonatal chronic lung disease in extremely immature baboons." Am J Respir Crit Care Med **160**(4): 1333-1346.
- Cock, M. L., C. A. Albuquerque, B. J. Joyce, S. B. Hooper and R. Harding (2001). "Effects of intrauterine growth restriction on lung liquid dynamics and lung development in fetal sheep." Am J Obstet Gynecol **184**(2): 209-216.
- Cock, M. L., B. J. Joyce, S. B. Hooper, M. J. Wallace, R. Gagnon, R. A. Brace, S. Louey and R. Harding (2004). "Pulmonary elastin synthesis and deposition in developing and mature sheep: effects of intrauterine growth restriction." Exp Lung Res **30**(5): 405-418.
- Cooney TP, T. W. (1982). "The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2-- Intrauterine and early postnatal lung growth." Thorax **37**(8): 580-583.
- Costeloe, K. L., E. M. Hennessy, S. Haider, F. Stacey, N. Marlow and E. S. Draper (2011). "Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies)." Bmj **345**: e7976.
- Dalziel, S. R., V. K. Lim, A. Lambert, D. McCarthy, V. Parag, A. Rodgers and J. E. Harding (2005). "Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial." Bmj **331**(7518): 665.

- Dalziel, S. R., N. K. Walker, V. Parag, C. Mantell, H. H. Rea, A. Rodgers and J. E. Harding (2005). "Cardiovascular risk factors after antenatal exposure to betamethasone: 30-year follow-up of a randomised controlled trial." *Lancet* **365**(9474): 1856-1862.
- Damodaram, M., L. Story, E. Kulinskaya, M. Rutherford and S. Kumar (2011). "Early adverse perinatal complications in preterm growth-restricted fetuses." *Aust N Z J Obstet Gynaecol* **51**(3): 204-209.
- Danan, C., M. L. Franco, P. H. Jarreau, G. Dassieu, B. Chailley-Heu, J. Bourbon and C. Delacourt (2002). "High concentrations of keratinocyte growth factor in airways of premature infants predicted absence of bronchopulmonary dysplasia." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(10): 1384-1387.
- De Paepe, M. E., D. Greco and Q. Mao (2010). "Angiogenesis-related gene expression profiling in ventilated preterm human lungs." *Exp Lung Res* **36**(7): 399-410.
- de Rooij, S. R., R. C. Painter, T. J. Roseboom, D. I. Phillips, C. Osmond, D. J. Barker, M. W. Tanck, R. P. Michels, P. M. Bossuyt and O. P. Bleker (2006). "Glucose tolerance at age 58 and the decline of glucose tolerance in comparison with age 50 in people prenatally exposed to the Dutch famine." *Diabetologia* **49**(4): 637-643.
- Delemos, R. A., J. J. Coalson, D. R. Gerstmann, T. J. Kuehl and D. M. Null, Jr. (1987). "Oxygen toxicity in the premature baboon with hyaline membrane disease." *Am Rev Respir Dis* **136**(3): 677-682.
- Desai, M., D. Gayle, J. Babu and M. G. Ross (2005). "Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**(1): R91-96.
- Diaz, V., M. N. Lebras-Isabet and A. Denjean (2005). "Effect of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced intrauterine growth restriction on postnatal lung growth in rats." *Pediatr Res* **58**(3): 557-561.
- Dirami, G., G. D. Massaro, L. B. Clerch, U. S. Ryan, P. R. Reczek and D. Massaro (2004). "Lung retinol storing cells synthesize and secrete retinoic acid, an inducer of alveolus formation." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**(2): L249-256.
- Durrmeyer, X., G. Kayem, M. Sinico, G. Dassieu, C. Danan and F. Decobert (2011). "Perinatal risk factors for bronchopulmonary dysplasia in extremely low gestational age infants: a pregnancy disorder-based approach." *J Pediatr* **160**(4): 578-583 e572.
- Economides, D. L., K. H. Nicolaides, E. A. Linton, L. A. Perry and T. Chard (1988). "Plasma cortisol and adrenocorticotropin in appropriate and small for gestational age fetuses." *Fetal Ther* **3**(3): 158-164.
- Eger, S. H., K. Sommerfelt, T. Kiserud and T. Markestad (2013). "Foetal umbilical artery Doppler in small preterms: (IQ) neurocognitive outcome at 5 years of age." *Acta Paediatr* **102**(4): 403-409.
- Ehrenkranz, R. A., M. C. Walsh, B. R. Vohr, A. H. Jobe, L. L. Wright, A. A. Fanaroff, L. A. Wraage and K. Poole (2005). "Validation of the National Institutes of Health consensus definition of bronchopulmonary dysplasia." *Pediatrics* **116**(6): 1353-1360.
- Emery, J. L. and A. Mithal (1960). "The number of alveoli in the terminal respiratory unit of man during late intrauterine life and childhood." *Arch Dis Child* **35**: 544-547.
- Ernst, L. M., C. M. Salafia, A. M. Carter and J. C. Pezzullo (1993). "Hepatic histology in intrauterine growth retardation following uterine artery ligation in the guinea pig." *Pediatr Pathol* **13**(6): 763-772.
- Fanaroff, A. A., B. J. Stoll, L. L. Wright, W. A. Carlo, R. A. Ehrenkranz, A. R. Stark, C. R. Bauer, E. F. Donovan, S. B. Korones, A. R. Laptook, J. A. Lemons, W. Oh, L. A. Papile, S. Shankaran, D. K. Stevenson, J. E. Tyson and W. K. Poole (2007). "Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants." *Am J Obstet Gynecol* **196**(2): 147 e141-148.
- Fehrenbach, H., R. Voswinckel, V. Michl, T. Mehling, A. Fehrenbach, W. Seeger and J. R. Nyengaard (2008). "Neoalveolarisation contributes to compensatory lung growth following pneumonectomy in mice." *Eur Respir J* **31**(3): 515-522.
- Ferdynus, C., C. Quantin, M. Abrahamowicz, R. Platt, A. Burguet, P. Sagot, C. Binquet and J. B. Gouyon (2009). "Can birth weight standards based on healthy populations improve the identification of small-for-gestational-age newborns at risk of adverse neonatal outcomes?" *Pediatrics* **123**(2): 723-730.
- Fernandez-Twinn, D. S., S. E. Ozanne, S. Ekizoglou, C. Doherty, L. James, B. Gusterson and C. N. Hales (2003). "The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction." *Br J Nutr* **90**(4): 815-822.

- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan and M. W. Moore (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." *Nature* **380**(6573): 439-442.
- Fily, A., V. Pierrat, V. Delporte, G. Breart, P. Truffert and E. N.-P.-d.-C. S. Group (2006). "Factors associated with neurodevelopmental outcome at 2 years after very preterm birth: the population-based Nord-Pas-de-Calais EPIPAGE cohort." *Pediatrics* **117**(2): 357-366.
- Fisher, K. A., A. Luger, B. H. Spargo and M. D. Lindheimer (1981). "Hypertension in pregnancy: clinical-pathological correlations and remote prognosis." *Medicine (Baltimore)* **60**(4): 267-276.
- Fong, G. H., J. Rossant, M. Gertsenstein and M. L. Breitman (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." *Nature* **376**(6535): 66-70.
- Franco-Montoya, M. L., O. Boucherat, C. Thibault, B. Chailley-Heu, R. Incitti, C. Delacourt and J. R. Bourbon (2011). "Profiling target genes of FGF18 in the postnatal mouse lung: possible relevance for alveolar development." *Physiol Genomics* **43**(21): 1226-1240.
- Franco-Montoya, M. L., J. R. Bourbon, X. Durrmeyer, S. Lorotte, P. H. Jarreau and C. Delacourt (2009). "Pulmonary effects of keratinocyte growth factor in newborn rats exposed to hyperoxia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**(5): L965-976.
- Franco, M. L., P. Waszak, G. Banalec, M. Levame, C. Lafuma, A. Harf and C. Delacourt (2002). "LPS-induced lung injury in neonatal rats: changes in gelatinase activities and consequences on lung growth." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**(3): L491-500.
- Frey, G., E. Egli, B. Chailley-Heu, M. Lelievre-Pegorier, P. H. Burri, J. Bourbon and S. A. Tschanz (2004). "Effects of mild vitamin a deficiency on lung maturation in newborn rats: a morphometric and morphologic study." *Biol Neonate* **86**(4): 259-268.
- Friedman, S. A., E. Schiff, J. J. Emeis, G. A. Dekker and B. M. Sibai (1995). "Biochemical corroboration of endothelial involvement in severe preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* **172**(1 Pt 1): 202-203.
- Gambling, L., H. S. Andersen, A. Czopek, R. Wojciak, Z. Krejpcio and H. J. McArdle (2004). "Effect of timing of iron supplementation on maternal and neonatal growth and iron status of iron-deficient pregnant rats." *J Physiol* **561**(Pt 1): 195-203.
- Gardosi, J. (2009). "Intrauterine growth restriction: new standards for assessing adverse outcome." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **23**(6): 741-749.
- Gardosi, J., A. Chang, B. Kalyan, D. Sahota and E. M. Symonds (1992). "Customised antenatal growth charts." *Lancet* **339**(8788): 283-287.
- Gardosi, J., M. Mongelli, M. Wilcox and A. Chang (1995). "An adjustable fetal weight standard." *Ultrasound Obstet Gynecol* **6**(3): 168-174.
- Garite, T. J., R. Clark and J. A. Thorp (2004). "Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates." *Am J Obstet Gynecol* **191**(2): 481-487.
- Garofano, A., P. Czernichow and B. Breant (1998). "Postnatal somatic growth and insulin contents in moderate or severe intrauterine growth retardation in the rat." *Biol Neonate* **73**(2): 89-98.
- Gauldie, J., T. Galt, P. Bonniaud, C. Robbins, M. Kelly and D. Warburton (2003). "Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia." *Am J Pathol* **163**(6): 2575-2584.
- Ghelfi, E., C. Karaaslan, S. Berkelhamer, S. Akar, H. Kozakewich and S. Cataltepe (2011). "Fatty acid-binding proteins and peribronchial angiogenesis in bronchopulmonary dysplasia." *Am J Respir Cell Mol Biol* **45**(3): 550-556.
- Ghelfi, E., Yu CW, Elmasri H, Terwelp M, Lee CG, Bhandari V, Comhair SA, Erzurum SC, Hotamisliqi GS, Elias JA, Cataltepe S (2013). "Fatty acid binding poreitn 4 regulates VEGF-induced airway angiogenesis and inflammation in a transgenic mouse model: implications for asthma." *American Journal of Pathology* **182**(4): 1425-1433.
- Giapros, V., A. Drougia, N. Krallis, P. Theocharis and S. Andronikou (2012). "Morbidity and mortality patterns in small-for-gestational age infants born preterm." *J Matern Fetal Neonatal Med* **25**(2): 153-157.
- Gicquel, C. and Y. Le Bouc (2006). "Hormonal regulation of fetal growth." *Horm Res* **65 Suppl 3**: 28-33.

- Gold, F. J. J. M.-M. D. (2010). "Retard de croissance intra-utérin." Encyclopédie Médico-Chirurgicale **4-002-S-80**.
- Gortner, L., R. R. Wauer, G. J. Stock, H. L. Reiter, I. Reiss, G. Jorch, R. Hentschel and G. Hieronimi (1999). "Neonatal outcome in small for gestational age infants: do they really better?" J Perinat Med **27**(6): 484-489.
- Greenough, A., B. Yuksel and P. Cheeseman (2004). "Effect of in utero growth retardation on lung function at follow-up of prematurely born infants." Eur Respir J **24**(5): 731-733.
- Guellec, I., A. Lapillonne, S. Renolleau, M. L. Charlaluk, J. C. Roze, S. Marret, R. Vieux, K. Monique, P. Y. Ancel and E. S. Group (2011). "Neurologic outcomes at school age in very preterm infants born with severe or mild growth restriction." Pediatrics **127**(4): e883-891.
- Hadchouel, A., F. Decobert, M. L. Franco-Montoya, I. Halphen, P. H. Jarreau, O. Boucherat, E. Martin, A. Benachi, S. Amselem, J. Bourbon, C. Danan and C. Delacourt (2008). "Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and bronchopulmonary dysplasia: identification of MMP16 as a new player in lung development." PLoS One **3**(9): e3188.
- Hadchouel, A., X. Durrmeyer, E. Bouzigon, R. Incitti, J. Huusko, P. H. Jarreau, R. Lenclen, F. Demenais, M. L. Franco-Montoya, I. Layouni, J. Patkai, J. Bourbon, M. Hallman, C. Danan and C. Delacourt (2011). "Identification of SPOCK2 as a susceptibility gene for bronchopulmonary dysplasia." Am J Respir Crit Care Med **184**(10): 1164-1170.
- Hales, C. N. and D. J. Barker (1992). "Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis." Diabetologia **35**(7): 595-601.
- Hall, S. M., A. A. Hislop and S. G. Haworth (2002). "Origin, differentiation, and maturation of human pulmonary veins." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(3): 333-340.
- Hansen, A. R., C. M. Barnes, J. Folkman and T. F. McElrath (2010). "Maternal preeclampsia predicts the development of bronchopulmonary dysplasia." J Pediatr **156**(4): 532-536.
- Haque, S. F., S. Izumi, H. Aikawa, T. Suzuki, H. Matsubayashi, T. Murano, G. Kika, M. Ikeda, K. Goya and T. Makino (2004). "Anesthesia and acoustic stress-induced intra-uterine growth retardation in mice." J Reprod Dev **50**(2): 185-190.
- Hasan, J., K. D. Beharry, A. M. Valencia, A. Strauss and H. D. Modanlou (2009). "Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in tracheal aspirate fluid of preterm neonates at birth may be predictive of bronchopulmonary dysplasia/chronic lung disease." Pediatrics **123**(6): 1541-1547.
- Hashimoto, S., Y. Gon, I. Takeshita, K. Matsumoto, S. Maruoka and T. Horie (2001). "Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway." Am J Respir Crit Care Med **163**(1): 152-157.
- He, H., V. J. Venema, X. Gu, R. C. Venema, M. B. Marrero and R. B. Caldwell (1999). "Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src." J Biol Chem **274**(35): 25130-25135.
- He, Y., S. K. Smith, K. A. Day, D. E. Clark, D. R. Licence and D. S. Charnock-Jones (1999). "Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity." Mol Endocrinol **13**(4): 537-545.
- Heinonen, K., K. Raikkonen, A. K. Pesonen, S. Andersson, E. Kajantie, J. G. Eriksson, D. Wolke and A. Lano (2010). "Behavioural symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder in preterm and term children born small and appropriate for gestational age: a longitudinal study." BMC Pediatr **10**: 91.
- Henderson-Smart, D. J., J. L. Hutchinson, D. A. Donoghue, N. J. Evans, J. M. Simpson and I. Wright (2006). "Prenatal predictors of chronic lung disease in very preterm infants." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **91**(1): F40-45.
- Hertig, A., N. Berkane, G. Lefevre, K. Toumi, H. P. Marti, J. Capeau, S. Uzan and E. Rondeau (2004). "Maternal serum sFlt1 concentration is an early and reliable predictive marker of preeclampsia." Clin Chem **50**(9): 1702-1703.
- Hertig, A. and P. Liere "New markers in preeclampsia." Clin Chim Acta **411**(21-22): 1591-1595.

- Hill, D. E., R. E. Myers, A. B. Holt, R. E. Scott and D. B. Cheek (1971). "Fetal growth retardation produced by experimental placental insufficiency in the rhesus monkey. II. Chemical composition of the brain, liver, muscle and carcass." *Biol Neonate* **19**(1): 68-82.
- Hind, M., J. Corcoran and M. Maden (2002). "Alveolar proliferation, retinoid synthesizing enzymes, and endogenous retinoids in the postnatal mouse lung. Different roles for Aldh-1 and Raldh-2." *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(1): 67-73.
- Hsu, C. D., B. Iriye, T. R. Johnson, F. R. Witter, S. F. Hong and D. W. Chan (1993). "Elevated circulating thrombomodulin in severe preeclampsia." *Am J Obstet Gynecol* **169**(1): 148-149.
- Huang, S. T., K. C. Vo, D. J. Lyell, G. H. Faessen, S. Tulac, R. Tibshirani, A. J. Giaccia and L. C. Giudice (2004). "Developmental response to hypoxia." *Faseb J* **18**(12): 1348-1365.
- Husain, A. N., N. H. Siddiqui and J. T. Stocker (1998). "Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia." *Hum Pathol* **29**(7): 710-717.
- Jakkula, M., T. D. Le Cras, S. Gebb, K. P. Hirth, R. M. Tuder, N. F. Voelkel and S. H. Abman (2000). "Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(3): L600-607.
- Jarvis, S., S. V. Glinianaia, C. Arnaud, J. Fauconnier, A. Johnson, V. McManus, M. Topp, P. Uvebrant, C. Cans, I. Krageloh-Mann and S. c. o. E. C. P. Registers (2005). "Case gender and severity in cerebral palsy varies with intrauterine growth." *Arch Dis Child* **90**(5): 474-479.
- Jensen, M. S., A. J. Wilcox, J. Olsen, J. P. Bonde, A. M. Thulstrup, C. H. Ramlau-Hansen and T. B. Henriksen (2012). "Cryptorchidism and hypospadias in a cohort of 934,538 Danish boys: the role of birth weight, gestational age, body dimensions, and fetal growth." *Am J Epidemiol* **175**(9): 917-925.
- Jobe, A. H. and E. Bancalari (2001). "Bronchopulmonary dysplasia." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(7): 1723-1729.
- Jobe, A. J. (1999). "The new BPD: an arrest of lung development." *Pediatr Res* **46**(6): 641-643.
- Joss-Moore, L., T. Carroll, Y. Yang, M. Fitzhugh, D. Metcalfe, J. Oman, M. Hale, L. Dong, Z. M. Wang, X. Yu, C. W. Callaway, E. O'Brien, R. A. McKnight, R. H. Lane and K. H. Albertine (2013). "Intrauterine growth restriction transiently delays alveolar formation and disrupts retinoic acid receptor expression in the lung of female rat pups." *Pediatr Res* **73**(5): 612-620.
- Joss-Moore, L. A., Y. Wang, M. L. Baack, J. Yao, A. W. Norris, X. Yu, C. W. Callaway, R. A. McKnight, K. H. Albertine and R. H. Lane (2010). "IUGR decreases PPARgamma and SETD8 Expression in neonatal rat lung and these effects are ameliorated by maternal DHA supplementation." *Early Hum Dev* **86**(12): 785-791.
- Joss-Moore, L. A., Y. Wang, X. Yu, M. S. Campbell, C. W. Callaway, R. A. McKnight, A. Wint, M. J. Dahl, R. O. Dull, K. H. Albertine and R. H. Lane (2011). "IUGR decreases elastin mRNA expression in the developing rat lung and alters elastin content and lung compliance in the mature rat lung." *Physiol Genomics* **43**(9): 499-505.
- Kabbinavar, F., H. I. Hurwitz, L. Fehrenbacher, N. J. Meropol, W. F. Novotny, G. Lieberman, S. Griffing and E. Bergsland (2003). "Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* **21**(1): 60-65.
- Kallapur, S. G., A. H. Jobe, M. Ikegami and C. J. Bachurski (2003). "Increased IP-10 and MIG expression after intra-amniotic endotoxin in preterm lamb lung." *Am J Respir Crit Care Med* **167**(5): 779-786.
- Kallapur, S. G., I. Nitsos, T. J. Moss, B. W. Kramer, J. P. Newnham, M. Ikegami and A. H. Jobe (2005). "Chronic endotoxin exposure does not cause sustained structural abnormalities in the fetal sheep lungs." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(5): L966-974.
- Kendall, R. L. and K. A. Thomas (1993). "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10705-10709.
- Kent, A. and J. E. Dahlstrom (2004). "Chorioamnionitis/funisitis and the development of bronchopulmonary dysplasia." *J Paediatr Child Health* **40**(7): 356-359.
- Kewitz, G., S. Wudel, H. Hopp, W. Hopfenmuller, M. Vogel and I. Roots (2008). "Below median birth weight in appropriate-for-gestational-age preterm infants as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia." *J Perinat Med* **36**(4): 359-364.



- Kida, K. and W. M. Thurlbeck (1980). "The effects of beta-aminopropionitrile on the growing rat lung." *Am J Pathol* **101**(3): 693-710.
- Kunig, A. M., V. Balasubramaniam, N. E. Markham, D. Morgan, G. Montgomery, T. R. Grover and S. H. Abman (2005). "Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**(4): L529-535.
- Kunig, A. M., V. Balasubramaniam, N. E. Markham, G. Seedorf, J. Gien and S. H. Abman (2006). "Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**(5): L1068-1078.
- Kunzmann, S., C. P. Speer, A. H. Jobe and B. W. Kramer (2007). "Antenatal inflammation induced TGF-beta1 but suppressed CTGF in preterm lungs." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**(1): L223-231.
- Lakshmi, C., G. Pramod, K. Geeta, S. Subramaniam, M. B. Rao, S. G. Kallapur and S. Murki (2013). "Outcome of Very Low Birth Weight Infants with Abnormal Antenatal Doppler Flow Patterns, A Prospective Cohort Study." *Indian Pediatr*.
- Lal, M. K., B. N. Manktelow, E. S. Draper and D. J. Field (2003). "Chronic lung disease of prematurity and intrauterine growth retardation: a population-based study." *Pediatrics* **111**(3): 483-487.
- Langley, S. C. and A. A. Jackson (1994). "Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets." *Clin Sci (Lond)* **86**(2): 217-222; discussion 121.
- Langston, C., K. Kida, M. Reed and W. M. Thurlbeck (1984). "Human lung growth in late gestation and in the neonate." *Am Rev Respir Dis* **129**(4): 607-613.
- Lapillonne, A., P. Braillon, O. Claris, P. G. Chatelain, P. D. Delmas and B. L. Salle (1997). "Body composition in appropriate and in small for gestational age infants." *Acta Paediatr* **86**(2): 196-200.
- Lau, M., A. Masood, M. Yi, R. Belcastro, J. Li and A. K. Tanswell (2011). "Long-term failure of alveologenesis after an early short-term exposure to a PDGF-receptor antagonist." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**(4): L534-547.
- Laughon, M. M., J. C. Langer, C. L. Bose, P. B. Smith, N. Ambalavanan, K. A. Kennedy, B. J. Stoll, S. Buchter, A. R. Laptook, R. A. Ehrenkranz, C. M. Cotten, D. E. Wilson-Costello, S. Shankaran, K. P. Van Meurs, A. S. Davis, M. G. Gantz, N. N. Finer, B. A. Yoder, R. G. Faix, W. A. Carlo, K. R. Schibler, N. S. Newman, W. Rich, A. Das, R. D. Higgins and M. C. Walsh (2011). "Prediction of bronchopulmonary dysplasia by postnatal age in extremely premature infants." *Am J Respir Crit Care Med* **183**(12): 1715-1722.
- Lavoie, P. M., C. Pham and K. L. Jang (2008). "Heritability of bronchopulmonary dysplasia, defined according to the consensus statement of the national institutes of health." *Pediatrics* **122**(3): 479-485.
- Leppanen, M., H. Lapinleimu, A. Lind, J. Matomaki, L. Lehtonen, L. Haataja, P. Rautava and P. S. Group (2014). "Antenatal and postnatal growth and 5-year cognitive outcome in very preterm infants." *Pediatrics* **133**(1): 63-70.
- Lesage, J., F. Del-Favero, M. Leonhardt, H. Louvart, S. Maccari, D. Vieau and M. Darnaudery (2004). "Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat." *J Endocrinol* **181**(2): 291-296.
- Ley, D., D. Wide-Svensson, M. Lindroth, N. Svenningsen and K. Marsal (1997). "Respiratory distress syndrome in infants with impaired intrauterine growth." *Acta Paediatr* **86**(10): 1090-1096.
- Liebeskind, A., S. Srinivasan, D. Kaetzel and M. Bruce (2000). "Retinoic acid stimulates immature lung fibroblast growth via a PDGF-mediated autocrine mechanism." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(1): L81-90.
- Lipsett, J., M. Tamblyn, K. Madigan, P. Roberts, J. C. Cool, S. I. Runciman, I. C. McMillen, J. Robinson and J. A. Owens (2006). "Restricted fetal growth and lung development: a morphometric analysis of pulmonary structure." *Pediatr Pulmonol* **41**(12): 1138-1145.
- Liu, B., C. S. Harvey and S. E. McGowan (1993). "Retinoic acid increases elastin in neonatal rat lung fibroblast cultures." *Am J Physiol* **265**(5 Pt 1): L430-437.
- Liu, C., M. Ikegami, M. T. Stahlman, C. R. Dey and J. A. Whitsett (2003). "Inhibition of alveolarization and altered pulmonary mechanics in mice expressing GATA-6." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(6): L1246-1254.

- Livinec, F., P. Y. Ancel, S. Marret, C. Arnaud, J. Fresson, V. Pierrat, J. C. Roze, B. Escande, G. Thiriez, B. Larroque, M. Kaminski and G. Epipage (2005). "Prenatal risk factors for cerebral palsy in very preterm singletons and twins." *Obstet Gynecol* **105**(6): 1341-1347.
- Lodygensky, G. A., M. L. Seghier, S. K. Warfield, C. B. Tolsa, S. Sizonenko, F. Lazeyras and P. S. Huppi (2008). "Intrauterine growth restriction affects the preterm infant's hippocampus." *Pediatr Res* **63**(4): 438-443.
- Longo, S., L. Bollani, L. Decembrino, A. Di Comite, M. Angelini and M. Stronati (2012). "Short-term and long-term sequelae in intrauterine growth retardation (IUGR)." *J Matern Fetal Neonatal Med* **26**(3): 222-225.
- Lubchenco, L. O., C. Hansman and E. Boyd (1966). "Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks." *Pediatrics* **37**(3): 403-408.
- Maki, J. M., R. Sormunen, S. Lippo, R. Kaarteenaho-Wiik, R. Soininen and J. Myllyharju (2005). "Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues." *Am J Pathol* **167**(4): 927-936.
- Mamelle, N., F. Munoz and H. Grandjean (1996). "[Fetal growth from the AUDIPOG study. I. Establishment of reference curves]." *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **25**(1): 61-70.
- Maritz, G. S., M. L. Cock, S. Louey, B. J. Joyce, C. A. Albuquerque and R. Harding (2001). "Effects of fetal growth restriction on lung development before and after birth: a morphometric analysis." *Pediatr Pulmonol* **32**(3): 201-210.
- Maritz, G. S., M. L. Cock, S. Louey, K. Suzuki and R. Harding (2004). "Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep." *Pediatr Res* **55**(2): 287-295.
- Martinussen, M., D. W. Flanders, B. Fischl, E. Busa, G. C. Lohaugen, J. Skranes, T. R. Vangberg, A. M. Brubakk, O. Haraldseth and A. M. Dale (2009). "Segmental brain volumes and cognitive and perceptual correlates in 15-year-old adolescents with low birth weight." *J Pediatr* **155**(6): 848-853 e841.
- Massaro, D., E. Alexander, K. Reiland, E. P. Hoffman, G. D. Massaro and L. B. Clerch (2007). "Rapid onset of gene expression in lung, supportive of formation of alveolar septa, induced by refeeding mice after calorie restriction." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**(5): L1313-1326.
- Massaro, G. D. and D. Massaro (1996). "Postnatal treatment with retinoic acid increases the number of pulmonary alveoli in rats." *Am J Physiol* **270**(2 Pt 1): L305-310.
- Massaro, G. D. and D. Massaro (1997). "Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats." *Nat Med* **3**(6): 675-677.
- Massaro, G. D., S. Radaeva, L. B. Clerch and D. Massaro (2002). "Lung alveoli: endogenous programmed destruction and regeneration." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**(2): L305-309.
- Maynard, S. E., J. Y. Min, J. Merchan, K. H. Lim, J. Li, S. Mondal, T. A. Libermann, J. P. Morgan, F. W. Sellke, I. E. Stillman, F. H. Epstein, V. P. Sukhatme and S. A. Karumanchi (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." *J Clin Invest* **111**(5): 649-658.
- McAdams, R. M., J. Vanderhoeven, R. P. Beyer, T. K. Bammler, F. M. Farin, H. D. Liggitt, R. P. Kapur, M. G. Gravett, C. E. Rubens and K. M. Adams Waldorf (2012). "Choriodecidual infection downregulates angiogenesis and morphogenesis pathways in fetal lungs from macaca nemestrina." *PLoS One* **7**(10): e46863.
- McDonald, T. J., K. L. Franko, J. M. Brown, S. L. Jenkins, P. W. Nathanielsz and M. J. Nijland (2003). "Betamethasone in the last week of pregnancy causes fetal growth retardation but not adult hypertension in rats." *J Soc Gynecol Investig* **10**(8): 469-473.
- McGowan, S., S. K. Jackson, M. Jenkins-Moore, H. H. Dai, P. Chambon and J. M. Snyder (2000). "Mice bearing deletions of retinoic acid receptors demonstrate reduced lung elastin and alveolar numbers." *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**(2): 162-167.
- McGowan, S. E., S. K. Jackson, M. M. Doro and P. J. Olson (1997). "Peroxisome proliferators alter lipid acquisition and elastin gene expression in neonatal rat lung fibroblasts." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 1): L1249-1257.

- McIntire, D. D., S. L. Bloom, B. M. Casey and K. J. Leveno (1999). "Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants." *N Engl J Med* **340**(16): 1234-1238.
- McMillen, I. C. and J. S. Robinson (2005). "Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming." *Physiol Rev* **85**(2): 571-633.
- Miller, M., J. Y. Cho, A. Pham, J. Ramsdell and D. H. Broide (2009). "Adiponectin and functional adiponectin receptor 1 are expressed by airway epithelial cells in chronic obstructive pulmonary disease." *J Immunol* **182**(1): 684-691.
- Mohamed, W. A., W. H. Niyazy and A. A. Mahfouz (2011). "Angiopoietin-1 and endostatin levels in cord plasma predict the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants." *J Trop Pediatr* **57**(5): 385-388.
- Morbidelli, L., C. H. Chang, J. G. Douglas, H. J. Granger, F. Ledda and M. Ziche (1996). "Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium." *Am J Physiol* **270**(1 Pt 2): H411-415.
- Moritz, K. M., G. B. Lim and E. M. Wintour (1997). "Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): R1829-1844.
- Morsing, E., P. Gustafsson and J. Brodzski (2011). "Lung function in children born after foetal growth restriction and very preterm birth." *Acta Paediatr* **101**(1): 48-54.
- Morty, R. E., M. Konigshoff and O. Eickelberg (2009). "Transforming growth factor-beta signaling across ages: from distorted lung development to chronic obstructive pulmonary disease." *Proc Am Thorac Soc* **6**(7): 607-613.
- Munoz, G. and I. Bongiorno-Malave (1979). "Influence of dietary protein restriction on ovulation, fertilization rates and pre-implantation embryonic development in mice." *J Exp Zool* **210**(2): 253-257.
- Murray, N. A. and I. A. Roberts (1996). "Circulating megakaryocytes and their progenitors in early thrombocytopenia in preterm neonates." *Pediatr Res* **40**(1): 112-119.
- Neerhof, M. G., S. Synowiec, S. Khan and L. G. Thaete (2011). "Pathophysiology of chronic nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction in the rat." *Hypertens Pregnancy* **30**(1): 28-36.
- Ng, Y. S., R. Rohan, M. E. Sunday, D. E. Demello and P. A. D'Amore (2001). "Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult." *Dev Dyn* **220**(2): 112-121.
- Nguyen, N. M., D. G. Kelley, J. A. Schlueter, M. J. Meyer, R. M. Senior and J. H. Miner (2005). "Epithelial laminin alpha5 is necessary for distal epithelial cell maturation, VEGF production, and alveolization in the developing murine lung." *Dev Biol* **282**(1): 111-125.
- Nikolajev, K., K. Heinonen, A. Hakulinen and E. Lansimies (1998). "Effects of intrauterine growth retardation and prematurity on spirometric flow values and lung volumes at school age in twin pairs." *Pediatr Pulmonol* **25**(6): 367-370.
- Northway, W. H., Jr., R. C. Rosan and D. Y. Porter (1967). "Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia." *N Engl J Med* **276**(7): 357-368.
- Novak, D. A., M. Desai and M. G. Ross (2006). "Gestational programming of offspring obesity/hypertension." *J Matern Fetal Neonatal Med* **19**(10): 591-599.
- Nyirenda, M. J., R. S. Lindsay, C. J. Kenyon, A. Burchell and J. R. Seckl (1998). "Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring." *J Clin Invest* **101**(10): 2174-2181.
- O'Brien, E. A., V. Barnes, L. Zhao, R. A. McKnight, X. Yu, C. W. Callaway, L. Wang, J. C. Sun, M. J. Dahl, A. Wint, Z. Wang, T. M. McIntyre, K. H. Albertine and R. H. Lane (2007). "Uteroplacental insufficiency decreases p53 serine-15 phosphorylation in term IUGR rat lungs." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**(1): R314-322.
- Ogata, E. S., M. E. Bussey and S. Finley (1986). "Altered gas exchange, limited glucose and branched chain amino acids, and hypoinsulinism retard fetal growth in the rat." *Metabolism* **35**(10): 970-977.
- Ogge, G., T. Chaiworapongsa, R. Romero, Y. Hussein, J. P. Kusanovic, L. Yeo, C. J. Kim and S. S. Hassan (2011). "Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia." *J Perinat Med* **39**(6): 641-652.

- Oh, W., B. B. Poindexter, R. Perritt, J. A. Lemons, C. R. Bauer, R. A. Ehrenkranz, B. J. Stoll, K. Poole and L. L. Wright (2005). "Association between fluid intake and weight loss during the first ten days of life and risk of bronchopulmonary dysplasia in extremely low birth weight infants." J Pediatr **147**(6): 786-790.
- Olivier, P., O. Baud, P. Evrard, P. Gressens and C. Verney (2005). "Prenatal ischemia and white matter damage in rats." J Neuropathol Exp Neurol **64**(11): 998-1006.
- Orgeig, S., T. A. Crittenden, C. Marchant, I. C. McMillen and J. L. Morrison (2005). "Intrauterine growth restriction delays surfactant protein maturation in the sheep fetus." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(4): L575-583.
- Ozanne, S. E., G. D. Smith, J. Tikerpaie and C. N. Hales (1996). "Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams." Am J Physiol **270**(4 Pt 1): E559-564.
- Ozkan, H., M. Cetinkaya and N. Koksall (2012). "Increased incidence of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants exposed to preeclampsia." J Matern Fetal Neonatal Med **25**(12): 2681-2685.
- Padela, S., M. Yi, J. Cabacungan, S. Shek, R. Belcastro, A. Masood, R. P. Jankov and A. K. Tanswell (2008). "A critical role for fibroblast growth factor-7 during early alveolar formation in the neonatal rat." Pediatr Res **63**(3): 232-238.
- Papile, L. A., J. Burstein, R. Burstein and H. Koffler (1978). "Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm." J Pediatr **92**(4): 529-534.
- Parera, M. C., M. van Dooren, M. van Kempen, R. de Krijger, F. Grosveld, D. Tibboel and R. Rottier (2005). "Distal angiogenesis: a new concept for lung vascular morphogenesis." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(1): L141-149.
- Paz, I., A. Laor, R. Gale, S. Harlap, D. K. Stevenson and D. S. Seidman (2001). "Term infants with fetal growth restriction are not at increased risk for low intelligence scores at age 17 years." J Pediatr **138**(1): 87-91.
- Peters, K., S. Werner, X. Liao, S. Wert, J. Whitsett and L. Williams (1994). "Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung." Embo J **13**(14): 3296-3301.
- Pierce, R. A., B. Joyce, S. Officer, C. Heintz, C. Moore, D. McCurnin, C. Johnston and W. Maniscalco (2007). "Retinoids increase lung elastin expression but fail to alter morphology or angiogenesis genes in premature ventilated baboons." Pediatr Res **61**(6): 703-709.
- Plumb, D. J., B. A. Dubaybo and L. A. Thet (1987). "Changes in lung tissue fibronectin content and synthesis during postnatal lung growth." Pediatr Pulmonol **3**(6): 413-419.
- Powell, P. P., C. C. Wang, H. Horinouchi, K. Shepherd, M. Jacobson, M. Lipson and R. Jones (1998). "Differential expression of fibroblast growth factor receptors 1 to 4 and ligand genes in late fetal and early postnatal rat lung." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(4): 563-572.
- Pratt, L., R. R. Magness, T. Phernetton, S. K. Hendricks, D. H. Abbott and I. M. Bird (1999). "Repeated use of betamethasone in rabbits: effects of treatment variation on adrenal suppression, pulmonary maturation, and pregnancy outcome." Am J Obstet Gynecol **180**(4): 995-1005.
- Pylipow, M., L. G. Spector, S. E. Puumala, C. Boys, J. Cohen and M. K. Georgieff (2009). "Early postnatal weight gain, intellectual performance, and body mass index at 7 years of age in term infants with intrauterine growth restriction." J Pediatr **154**(2): 201-206.
- Redmer, D. A., J. S. Luther, J. S. Milne, R. P. Aitken, M. L. Johnson, P. P. Borowicz, M. A. Borowicz, L. P. Reynolds and J. M. Wallace (2009). "Fetoplacental growth and vascular development in overnourished adolescent sheep at day 50, 90 and 130 of gestation." Reproduction **137**(4): 749-757.
- Rehan, V. K., R. Sakurai, Y. Li, A. Karadag, J. Corral, S. Bellusci, Y. Y. Xue, J. Belperio and J. S. Torday (2009). "Effects of maternal food restriction on offspring lung extracellular matrix deposition and long term pulmonary function in an experimental rat model." Pediatr Pulmonol **47**(2): 162-171.
- Rehan, V. K. and J. S. Torday (2012). "PPARgamma Signaling Mediates the Evolution, Development, Homeostasis, and Repair of the Lung." PPAR Res **2012**: 289867.

- Reiss, I., E. Landmann, M. Heckmann, B. Misselwitz and L. Gortner (2003). "Increased risk of bronchopulmonary dysplasia and increased mortality in very preterm infants being small for gestational age." *Arch Gynecol Obstet* **269**(1): 40-44.
- Resnick, O. and P. J. Morgane (1983). "Animal models for small-for-gestational-age (SGA) neonates and infants-at-risk (IAR)." *Brain Res* **312**(2): 221-225.
- Resnik, R. (2007). "One size does not fit all." *Am J Obstet Gynecol* **197**(3): 221-222.
- Roberts, J. M. (1998). "Endothelial dysfunction in preeclampsia." *Semin Reprod Endocrinol* **16**(1): 5-15.
- Roberts, J. M. (2000). "Preeclampsia: what we know and what we do not know." *Semin Perinatol* **24**(1): 24-28.
- Rojas, M. A., A. Gonzalez, E. Bancalari, N. Claire, C. Poole and G. Silva-Neto (1995). "Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease." *J Pediatr* **126**(4): 605-610.
- Rosenberg, A. (2008). "The IUGR newborn." *Semin Perinatol* **32**(3): 219-224.
- Sakurai, R., P. Villarreal, S. Husain, J. Liu, T. Sakurai, E. Tou, J. S. Torday and V. K. Rehan (2013). "Curcumin protects the developing lung against long-term hyperoxic injury." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **305**(4): L301-311.
- Sanchez-Elsner, T., L. M. Botella, B. Velasco, C. Langa and C. Bernabeu (2002). "Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways." *J Biol Chem* **277**(46): 43799-43808.
- Scholl, T. O. and M. L. Hediger (1994). "Anemia and iron-deficiency anemia: compilation of data on pregnancy outcome." *Am J Clin Nutr* **59**(2 Suppl): 492S-500S discussion 500S-501S.
- Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman and A. C. Schuh (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* **376**(6535): 62-66.
- Shennan, A. T., M. S. Dunn, A. Ohlsson, K. Lennox and E. M. Hoskins (1988). "Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period." *Pediatrics* **82**(4): 527-532.
- Shindo, T., Y. Kurihara, H. Nishimatsu, N. Moriyama, M. Kakoki, Y. Wang, Y. Imai, A. Ebihara, T. Kuwaki, K. H. Ju, N. Minamino, K. Kangawa, T. Ishikawa, M. Fukuda, Y. Akimoto, H. Kawakami, T. Imai, H. Morita, Y. Yazaki, R. Nagai, Y. Hirata and H. Kurihara (2001). "Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene." *Circulation* **104**(16): 1964-1971.
- Silva, D., M. Venihaki, W. H. Guo and M. F. Lopez (2006). "Igf2 deficiency results in delayed lung development at the end of gestation." *Endocrinology* **147**(12): 5584-5591.
- Simic Klaric, A., Z. Kolundzic, S. Galic and V. Mejaski Bosnjak (2012). "Language development in preschool children born after asymmetrical intrauterine growth retardation." *Eur J Paediatr Neurol* **16**(2): 132-137.
- Simon, D. M., M. C. Arian, S. Srisuma, S. Bhattacharya, T. Andalcio, S. D. Shapiro and T. J. Mariani (2006). "Epithelial cell PPARgamma is an endogenous regulator of normal lung maturation and maintenance." *Proc Am Thorac Soc* **3**(6): 510-511.
- Sizonenko, S. V., C. Borradori-Tolsa and P. S. Huppi (2008). "[Intrauterine growth restriction: impact on brain development and function]." *Rev Med Suisse* **4**(146): 509-510, 512-504.
- Slater-Jefferies, J. L., K. A. Lillycrop, P. A. Townsend, C. Torrens, S. P. Hoile, M. A. Hanson and G. C. Burdge (2011). "Feeding a protein-restricted diet during pregnancy induces altered epigenetic regulation of peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha in the heart of the offspring." *J Dev Orig Health Dis* **2**(4): 250-255.
- Snoeck, A., C. Remacle, B. Reusens and J. J. Hoet (1990). "Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas." *Biol Neonate* **57**(2): 107-118.
- Soregaroli, M., R. Bonera, L. Danti, D. Dinolfo, F. Taddei, A. Valcamonico and T. Frusca (2002). "Prognostic role of umbilical artery Doppler velocimetry in growth-restricted fetuses." *J Matern Fetal Neonatal Med* **11**(3): 199-203.
- Speer, C. P. (2009). "Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia." *Neonatology* **95**(4): 353-361.

- Spinillo, A., E. Capuzzo, G. Piazzzi, F. Baltaro, M. Stronati and A. Ometto (1997). "Significance of low birthweight for gestational age among very preterm infants." *Br J Obstet Gynaecol* **104**(6): 668-673.
- Stein, A. D., P. A. Zybert, K. van der Pal-de Bruin and L. H. Lumey (2006). "Exposure to famine during gestation, size at birth, and blood pressure at age 59 y: evidence from the Dutch Famine." *Eur J Epidemiol* **21**(10): 759-765.
- Stimac, T., O. Petrovic, R. Krajina, M. Prodan and L. Bilic-Zulle (2012). "Lamellar body count as a diagnostic test in predicting neonatal respiratory distress syndrome." *Croat Med J* **53**(3): 234-238.
- Strauss, R. S. (2000). "Adult functional outcome of those born small for gestational age: twenty-six-year follow-up of the 1970 British Birth Cohort." *JAMA* **283**(5): 625-632.
- Streimish, I. G., R. A. Ehrenkranz, E. N. Allred, T. M. O'Shea, K. C. Kuban, N. Paneth, A. Leviton and E. S. Investigators (2012). "Birth weight- and fetal weight-growth restriction: impact on neurodevelopment." *Early Hum Dev* **88**(9): 765-771.
- Summer, R., F. F. Little, N. Ouchi, Y. Takemura, T. Aprahamian, D. Dwyer, K. Fitzsimmons, B. Suki, H. Parameswaran, A. Fine and K. Walsh (2008). "Alveolar macrophage activation and an emphysema-like phenotype in adiponectin-deficient mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**(6): L1035-1042.
- Supramaniam, V. G., G. Jenkin, J. Loose, E. M. Wallace and S. L. Miller (2006). "Chronic fetal hypoxia increases activin A concentrations in the late-pregnant sheep." *Bjog* **113**(1): 102-109.
- Taichman, D. B., S. K. Schachtner, Y. Li, M. C. Puri, A. Bernstein and H. Scott Baldwin (2003). "A unique pattern of Tie1 expression in the developing murine lung." *Exp Lung Res* **29**(2): 113-122.
- Tang, J. R., S. A. Karumanchi, G. Seedorf, N. Markham and S. H. Abman (2011). "Excess soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in amniotic fluid impairs lung growth in rats: linking preeclampsia with bronchopulmonary dysplasia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**(1): L36-46.
- Taylor, R. N., W. R. Crombleholme, S. A. Friedman, L. A. Jones, D. C. Casal and J. M. Roberts (1991). "High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone." *Am J Obstet Gynecol* **165**(4 Pt 1): 895-901.
- Ten Have-Opbroek, A. A. (1981). "The development of the lung in mammals: an analysis of concepts and findings." *Am J Anat* **162**(3): 201-219.
- Thebaud, B. (2007). "Angiogenesis in lung development, injury and repair: implications for chronic lung disease of prematurity." *Neonatology* **91**(4): 291-297.
- Thebaud, B. and T. Lacaze-Masmonteil (2010). "If your placenta doesn't have it, chances are your lungs don't have it either: the "vascular hypothesis" of bronchopulmonary dysplasia starts in utero." *J Pediatr* **156**(4): 521-523.
- Thebaud, B., F. Ladha, E. D. Michelakis, M. Sawicka, G. Thurston, F. Eaton, K. Hashimoto, G. Harry, A. Haromy, G. Korbitt and S. L. Archer (2005). "Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization." *Circulation* **112**(16): 2477-2486.
- Thibeault, D. W., S. M. Mabry, Ekekezie, II, X. Zhang and W. E. Truog (2003). "Collagen scaffolding during development and its deformation with chronic lung disease." *Pediatrics* **111**(4 Pt 1): 766-776.
- Thomas, W., S. Seidenspinner, B. W. Kramer, N. Kawczynska-Leda, M. Chmielnicka-Kopaczky, A. Marx, J. Wirbelauer, M. Szymankiewicz and C. P. Speer (2009). "Airway concentrations of angiopoietin-1 and endostatin in ventilated extremely premature infants are decreased after funisitis and unbalanced with bronchopulmonary dysplasia/death." *Pediatr Res* **65**(4): 468-473.
- Thorn, S. R., L. D. Brown, P. J. Rozance, W. W. Hay, Jr. and J. E. Friedman (2013). "Increased hepatic glucose production in fetal sheep with intrauterine growth restriction is not suppressed by insulin." *Diabetes* **62**(1): 65-73.
- Thornton, J. G., J. Hornbuckle, A. Vail, D. J. Spiegelhalter, M. Levene and G. s. group (2004). "Infant wellbeing at 2 years of age in the Growth Restriction Intervention Trial (GRIT): multicentred randomised controlled trial." *Lancet* **364**(9433): 513-520.

- Tolsa, C. B., S. Zimine, S. K. Warfield, M. Freschi, A. Sancho Rossignol, F. Lazeyras, S. Hanquinet, M. Pfizenmaier and P. S. Huppi (2004). "Early alteration of structural and functional brain development in premature infants born with intrauterine growth restriction." *Pediatr Res* **56**(1): 132-138.
- Toporsian, M., R. Gros, M. G. Kabir, S. Vera, K. Govindaraju, D. H. Eidelman, M. Husain and M. Letarte (2005). "A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia." *Circ Res* **96**(6): 684-692.
- Torrance, H. L., J. B. Derks, S. A. Scherjon, L. D. Wijnberger and G. H. Visser (2009). "Is antenatal steroid treatment effective in preterm IUGR fetuses?" *Acta Obstet Gynecol Scand* **88**(10): 1068-1073.
- Torrance, H. L., H. A. Voorbij, L. D. Wijnberger, F. van Bel and G. H. Visser (2008). "Lung maturation in small for gestational age fetuses from pregnancies complicated by placental insufficiency or maternal hypertension." *Early Hum Dev* **84**(7): 465-469.
- Torry, D. S. and R. J. Torry (1997). "Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta." *Am J Reprod Immunol* **37**(1): 21-29.
- Tsao, P. N., H. Li, S. C. Wei, M. L. Ko, H. C. Chou, W. S. Hsieh and F. J. Hsieh (2004). "Expression of angiogenic factors and their receptors in postnatal mouse developing lung." *J Formos Med Assoc* **103**(2): 137-143.
- Tsao, P. N., S. C. Wei, Y. N. Su, H. C. Chou, C. Y. Chen and W. S. Hsieh (2005). "Excess soluble fms-like tyrosine kinase 1 and low platelet counts in premature neonates of preeclamptic mothers." *Pediatrics* **116**(2): 468-472.
- Tyson, J. E., K. Kennedy, S. Broyles and C. R. Rosenfeld (1995). "The small for gestational age infant: accelerated or delayed pulmonary maturation? Increased or decreased survival?" *Pediatrics* **95**(4): 534-538.
- Vadivel, A., S. Abozaid, T. van Haaften, M. Sawicka, F. Eaton, M. Chen and B. Thebaud (2010). "Adrenomedullin promotes lung angiogenesis, alveolar development, and repair." *Am J Respir Cell Mol Biol* **43**(2): 152-160.
- Vadivel, A., J. L. Aschner, G. J. Rey-Parra, J. Magarik, H. Zeng, M. Summar, F. Eaton and B. Thebaud (2010). "L-Citrulline attenuates arrested alveolar growth and pulmonary hypertension in oxygen-induced lung injury in newborn rats." *Pediatr Res*.
- Vaiman, D., G. Gascoin-Lachambre, F. Boubred, F. Mondon, J. M. Feuerstein, I. Ligi, I. Grandvuillemin, S. Barbaux, E. Ghigo, V. Achard, U. Simeoni and C. Buffat (2011). "The intensity of IUGR-induced transcriptome deregulations is inversely correlated with the onset of organ function in a rat model." *PLoS One* **6**(6): e21222.
- Varet, J., L. Vincent, P. Mirshahi, J. V. Pille, E. Legrand, P. Opolon, Z. Mishal, J. Soria, H. Li and C. Soria (2003). "Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo." *Cell Mol Life Sci* **60**(4): 810-819.
- Venkatesha, S., M. Toporsian, C. Lam, J. Hanai, T. Mammoto, Y. M. Kim, Y. Bdoiah, K. H. Lim, H. T. Yuan, T. A. Libermann, I. E. Stillman, D. Roberts, P. A. D'Amore, F. H. Epstein, F. W. Sellke, R. Romero, V. P. Sukhatme, M. Letarte and S. A. Karumanchi (2006). "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia." *Nat Med* **12**(6): 642-649.
- Viscardi, R. M., C. K. Muhumuza, A. Rodriguez, K. D. Fairchild, C. C. Sun, G. W. Gross, A. B. Campbell, P. D. Wilson, L. Hester and J. D. Hasday (2004). "Inflammatory markers in intrauterine and fetal blood and cerebrospinal fluid compartments are associated with adverse pulmonary and neurologic outcomes in preterm infants." *Pediatr Res* **55**(6): 1009-1017.
- Vuguin, P., E. Raab, B. Liu, N. Barzilai and R. Simmons (2004). "Hepatic insulin resistance precedes the development of diabetes in a model of intrauterine growth retardation." *Diabetes* **53**(10): 2617-2622.
- Vuguin, P. M. (2007). "Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease." *Horm Res* **68**(3): 113-123.
- Walsh, M. C., Q. Yao, P. Gettner, E. Hale, M. Collins, A. Hensman, R. Everette, N. Peters, N. Miller, G. Muran, K. Auten, N. Newman, G. Rowan, C. Grisby, K. Arnell, L. Miller, B. Ball and G. McDavid (2004). "Impact of a physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates." *Pediatrics* **114**(5): 1305-1311.

- Wan, H., K. H. Kaestner, S. L. Ang, M. Ikegami, F. D. Finkelman, M. T. Stahlman, P. C. Fulkerson, M. E. Rothenberg and J. A. Whitsett (2004). "Foxa2 regulates alveolarization and goblet cell hyperplasia." Development **131**(4): 953-964.
- Wang, Y., K. Sakamoto, J. Khosla and P. L. Sannes (2002). "Detection of chondroitin sulfates and decorin in developing fetal and neonatal rat lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(3): L484-490.
- Ward Platt, M. and S. Deshpande (2005). "Metabolic adaptation at birth." Semin Fetal Neonatal Med **10**(4): 341-350.
- Wasiluk, A., M. Mantur, H. Kemon, M. Szczepanski, E. Jasinska and R. Milewski (2009). "Thrombopoiesis in small for gestational age newborns." Platelets **20**(7): 520-524.
- Weibel, E. R. and L. M. Cruz-Orive (1997). Morphometric methods. The Lung: Scientific Foundations (2nd ed.). Raven. Philadelphia, Crystal RG and West JB: 333-344.
- Weinstein, M., X. Xu, K. Ohya and C. X. Deng (1998). "FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung." Development **125**(18): 3615-3623.
- Wendel, D. P., D. G. Taylor, K. H. Albertine, M. T. Keating and D. Y. Li (2000). "Impaired distal airway development in mice lacking elastin." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(3): 320-326.
- Wigglesworth, J. S. (1964). "Experimental Growth Retardation in the Foetal Rat." J Pathol Bacteriol **88**: 1-13.
- Wignarajah, D., M. L. Cock, K. E. Pinkerton and R. Harding (2002). "Influence of intrauterine growth restriction on airway development in fetal and postnatal sheep." Pediatr Res **51**(6): 681-688.
- Willet, K. E., A. H. Jobe, M. Ikegami, J. Newnham, S. Brennan and P. D. Sly (2000). "Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs." Pediatr Res **48**(6): 782-788.
- Young, M. and E. M. Widdowson (1975). "The influence of diets deficient in energy, or in protein, on conceptus weight, and the placental transfer of a non-metabolisable amino acid in the guinea pig." Biol Neonate **27**(3-4): 184-191.
- Younoszai, M. K., J. Peloso and J. C. Haworth (1969). "Fetal growth retardation in rats exposed to cigarette smoke during pregnancy." Am J Obstet Gynecol **104**(8): 1207-1213.
- Zeitlin, J., E. S. Draper, L. Kollee, D. Milligan, K. Boerch, R. Agostino, L. Gortner, P. Van Reempts, J. L. Chabernaude, J. Gadzinowski, G. Breart and E. Papiernik (2008). "Differences in rates and short-term outcome of live births before 32 weeks of gestation in Europe in 2003: results from the MOSAIC cohort." Pediatrics **121**(4): e936-944.
- Zeitlin, J., M. El Ayoubi, P. H. Jarreau, E. S. Draper, B. Blondel, W. Kunzel, M. Cuttini, M. Kaminski, L. Gortner, P. Van Reempts, L. Kollee and E. Papiernik (2010). "Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort." J Pediatr **157**(5): 733-739 e731.
- Zeltner, T. B., J. H. Caduff, P. Gehr, J. Pfenninger and P. H. Burri (1987). "The postnatal development and growth of the human lung. I. Morphometry." Respir Physiol **67**(3): 247-267.
- Zhang, J., S. Meikle and A. Trumble (2003). "Severe maternal morbidity associated with hypertensive disorders in pregnancy in the United States." Hypertens Pregnancy **22**(2): 203-212.
- Zhou, Y., C. H. Damsky and S. J. Fisher (1997). "Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome?" J Clin Invest **99**(9): 2152-2164.



# ANNEXES

Revue de la littérature

# **Annexe 1**

## **Retard de croissance intra-utérin et développement pulmonaire: approche expérimentale et clinique**

### **Intrauterine growth and lung development**

E. Zana-Taïeb, M.-S. Aubelle, M. El Ayoubi, E. Lopez, P.-H. Jarreau

0929-693X/\$ - see front matter \_ 2013 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arcped.2013.06.019> Archives de Pédiatrie 2013;20:1053-1058

#### **Summary**

Epidemiological studies have shown that intrauterine growth restriction is associated with increased respiratory morbidity in the neonatal period with an increased risk of bronchopulmonary dysplasia. Respiratory consequences of environmental intrauterine changes extend into childhood and adulthood with abnormal lung function tests. In animal models, changes in surfactant and alveolarization disorders vary from one study to another. Moreover, the molecular mechanisms involved are poorly understood. Fetal adaptations to intrauterine malnutrition result in permanent changes in lung structure, raising the question of lung “programming”.

## **Annexe 2**

## Retard de croissance intra-utérin et dysplasie bronchopulmonaire

Elodie Zana-Taïeb, Pierre-Henri Jarreau

Service de médecine et réanimation néonatales de Port-Royal, Hôpital Cochin, 53, avenue de l'Observatoire, 75014 Paris, France ; Inserm U767, Fondation PremUP, Paris, France. [pierre-henri.jarreau@cch.aphp.fr](mailto:pierre-henri.jarreau@cch.aphp.fr)

► Le retard de croissance intra-utérin (RCIU), défini comme une croissance inférieure au 10<sup>e</sup> percentile pour l'âge gestationnel, est une des principales pathologies faisant poser l'indication d'un accouchement prématuré. La cause la plus fréquente de RCIU est la pré-éclampsie maternelle (20 à 30 % des cas), puis viennent les causes génétiques et infectieuses (10 à 30 %). Pendant la vie intra-utérine, les fœtus atteints de RCIU sont hypoxiques et en situation de malnutrition. À l'heure actuelle, il n'existe pas de stratégie préventive ou thérapeutique du RCIU.

Les nouveau-nés atteints de RCIU (hypotrophes à la naissance) sont à risque de présenter de multiples pathologies à court et à long terme. En période néonatale, ces enfants, comparés aux enfants eutrophes de même terme, ont une mortalité augmentée et plus de difficultés d'adaptation à la vie post-natale. Sur le plan respiratoire, ils présentent une incidence plus importante de maladie des membranes hyalines ou d'hypertension artérielle pulmonaire primitive [15]. Ils ont aussi un risque plus élevé de complications multiples : thrombopénie, polyglobulie, intolérance glucidique, entérocologie ulcéro-nécrosante [1]. Plus tard, ces enfants présentent plus d'anomalies de la croissance et du développement psychomoteur [1]. À long terme, les antécédents d'hypotrophie par RCIU semblent « programmer » le développement d'un phénotype dit « économe » avec une augmentation de la prise alimentaire et une diminu-

tion de la consommation d'énergie [1]. Ceci aboutit à l'âge adulte, surtout en cas d'apports caloriques non limités, à l'apparition d'une obésité et d'autres manifestations du syndrome métabolique [2].

Le RCIU a été mis en évidence plus récemment comme un facteur de risque indépendant de dysplasie bronchopulmonaire (DBP) (voir *Encadré*). Une étude australienne et néo-zélandaise retrouve, dans une population de terme identique constituée de plus de 11 000 enfants nés entre 1998 et 2001, un risque augmenté de près d'un facteur 6 [3]. Une étude européenne récente en population (étude MOSAIC) dans 10 pays, regroupant plus de 4 500 enfants nés en 2003, observe, à nouveau, un risque relatif de DBP augmenté de près d'un facteur 6 chez les hypotrophes [4]. Le rôle du poids de naissance est encore plus important chez les enfants nés avant 28 SA (semaines d'aménorrhée), dont le risque de DBP est augmenté, quand le poids de naissance est inférieur au poids médian [5]. Plusieurs études réalisées dans l'enfance et à l'âge adulte chez des patients porteurs d'un RCIU ont montré une anomalie persistante de la fonction respiratoire étudiée par des explorations fonctionnelles. Ainsi, chez des nourrissons de 10 mois (6-24 mois), on observe une augmentation de la résistance des voies aériennes chez les anciens hypotrophes [6].

La pré-éclampsie étant une pathologie exclusivement humaine, plusieurs modèles expérimentaux ont été déve-

loppés pour étudier les conséquences pulmonaires du RCIU. Chez le mouton et le rat, des modèles d'insuffisance placentaire (embolisation ombilico-placentaire) sont utilisés [7]. Chez le rat ou la souris, un RCIU peut également être induit par une restriction calorique et/ou protidique maternelle, un stress maternel (perturbation du rythme circadien) ou l'injection de L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester, un inhibiteur de la synthèse de NO [nitric oxide] qui est un puissant vasodilatateur) [7]. Les résultats des différentes études sont discordants. G.S. Maritz a montré, chez l'agneau de 8 semaines ayant souffert d'un RCIU, une diminution du nombre d'alvéoles avec un élargissement de celles-ci, persistant chez l'animal adulte [8]. D'autres études chez l'agneau ont également montré des anomalies des voies aériennes (trachée et bronches) chez les animaux porteurs d'un RCIU [9]. Dans un modèle de RCIU induit par l'injection de L-NAME chez le rat, il a été montré une diminution de la surface alvéolaire à la naissance, persistant à 7 jours de vie post-natale mais totalement corrigée à 21 jours de vie (à la fin de l'alvéolisation) [10]. Nous avons comparé différents modèles de RCIU chez le raton. Nos résultats confirment les résultats obtenus par V. Diaz mais, en induisant un RCIU par une restriction protidique maternelle pendant toute la grossesse, nous observons une diminution de la surface alvéolaire dès 10 jours de vie, qui persiste ensuite. Associées aux anomalies de



## LA DYSPLASIE BRONCHOPULMONAIRE

Pierre-Henri Jarreau, Christophe Delacourt

La dysplasie bronchopulmonaire (DBP) est une pathologie décrite initialement à la fin des années 1960 comme la principale séquelle respiratoire des grands prématurés. Sur le plan respiratoire, l'immaturité initiale de ces enfants est caractérisée par un développement pulmonaire qui se situe à un stade très précoce et par un déficit en surfactant, substance tensio-active qui permet de maintenir les alvéoles ouverts en fin d'expiration. L'absence de surfactant conduit à la « maladie des membranes hyalines », principale pathologie respiratoire du prématuré, qui se traite par la ventilation mécanique et l'administration de surfactant directement dans les poumons. La DBP est le développement d'une pathologie respiratoire chronique et est définie par la nécessité d'un apport en oxygène ou d'un support respiratoire (ventilation mécanique) chez des enfants prématurés 28 jours après la naissance. L'évaluation de l'état respiratoire à 36 semaines d'âge post-ménstruel (SA, semaines d'aménorrhée), donc au-delà des 28 jours de vie si l'enfant est né avant 32 SA, caractérise sa gravité et est mieux corrélée au devenir respiratoire à moyen et long terme. Les enfants les plus sévèrement atteints sont en effet exposés à des réhospitalisations multiples pendant les 2 premières années de vie, le plus souvent pour une cause respiratoire. À long terme, leur fonction respiratoire peut être altérée et l'on observe plus de diagnostics d'« asthme ». Enfin, la DBP a des conséquences sur le développement neurologique.

C'est avant tout une pathologie de la grande prématurité (terme inférieur ou égal à 32 SA, soit 7 mois de grossesse) qui représente 1,5 % des naissances en France. La DBP survient chez environ 15 % à 20 % de ces enfants nés en Europe, ce taux semblant un peu plus élevé en Amérique du Nord. Elle a longtemps été considérée comme la conséquence de la prise en charge des détresses respiratoires néonatales. Les progrès réalisés dans le domaine n'ont pas apporté de diminution spectaculaire de sa fréquence mais ont permis une diminution des agressions subies parallèlement à l'augmentation de la survie de prématurés de plus en plus immatures, amenant une modification des lésions observées. Ceci est

à l'origine du concept de « nouvelle » DBP, correspondant aux formes moins sévères, observées notamment depuis l'utilisation large du surfactant.

Il existe néanmoins de nombreux points communs entre les formes « ancienne » et « nouvelle », qui sont caractérisées par un arrêt de l'alvéolisation, aboutissant à un nombre d'alvéoles diminué par rapport à ce qu'il devrait être. En effet, la dernière phase du développement pulmonaire est le stade « alvéolaire », qui commence peu avant la naissance (vers 36 SA) et va se poursuivre au cours des deux premières années de la vie. Les grands prématurés naissent donc à un stade qui précède le développement alvéolaire, mais celui-ci est compromis par les événements qui l'ont précédé. La DBP est donc avant tout une pathologie du développement pulmonaire distal, potentiellement aggravée par une réponse inadaptée aux agressions extérieures.

Les données épidémiologiques traduisent imparfaitement la réalité : la DBP a certainement diminué en fréquence et en gravité chez les « moins » immatures, mais reste peu sensible aux progrès de la prise en charge chez les « extrêmes prématurés » nés avant 28 SA. Plusieurs facteurs sont en cause : l'importance de l'immaturité pulmonaire, en particulier chez les enfants trop petits pour leur terme (hypotrophes), le rôle des phénomènes inflammatoires locaux qui sont la voie finale commune de la majeure partie des agressions, et l'importance de facteurs de risque génétiques qui pourraient expliquer cette persistance d'un taux incompressible de DBP malgré l'amélioration constante des soins.

Ces 3 facteurs ont été ou sont l'objet de thèses réalisées dans le cadre de la fondation de coopération scientifique PremUP « Grossesse et Prématurité » et leurs auteurs en font le point dans ce dossier [1-3].

1. Zana-Taïeb E, Jarreau PH. Retard de croissance intra-utérin et dysplasie bronchopulmonaire. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 826-8.

2. Hachehouel A, Delacourt C. Dysplasie bronchopulmonaire et génétique. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 821-3.

3. Lopez E, Jarreau PH. Inflammation et dysplasie bronchopulmonaire. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 823-5.

l'alvéolisation, l'existence d'un dysfonctionnement des cellules endothéliales des artères pulmonaires a été démontré très récemment avec une diminution de la densité vasculaire de 44 % par rapport aux témoins [11].

Les mécanismes physiopathologiques de ces anomalies restent mal compris et les résultats sont là encore discordants selon le modèle de RCIU étudié. Des facteurs de croissance ou des facteurs de transcription comme PPAR $\gamma$  [12] semblent participer aux troubles de l'alvéolisation. Ainsi, L.A. Joss-Moore observe une diminution des transcrits des gènes régulant la voie de l'élastine

chez le rat [13] alors que M.L. Cock, chez le mouton, ne retrouve pas de différence [14].

En conclusion, le RCIU est un facteur de risque indépendant de développer une DBP et ces anomalies de la fonction respiratoire persistent chez l'adulte. Les résultats des modèles expérimentaux sont discordants et les mécanismes physiopathologiques restent à élucider. ♦

### In utero growth retardation and bronchopulmonary dysplasia

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

1. Rosenberg A. The IUGR newborn. *Semin Perinatol* 2008 ; 32 : 219-24.
2. Barker DJ, Eriksson JG, Forsen T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002 ; 31 : 1235-9.
3. Henderson-Smart DJ, Hutchinson JL, Donoghue DA, et al. Prenatal predictors of chronic lung disease in very preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006 ; 91 : F40-5.
4. Zeitlin J, El Ayoubi M, Jarreau PH, et al. Impact of fetal growth restriction on mortality and morbidity in a very preterm birth cohort. *J Pediatr* ; 157 : 733-9 e1.
5. Kewitz G, Wudel S, Hopp H, et al. Below median birth weight in appropriate-for-gestational-age preterm infants as a risk factor for bronchopulmonary dysplasia. *J Perinat Med* 2008 ; 36 : 359-64.
6. Greenough A, Yuksel B, Cheeseman P. Effect of in utero growth retardation on lung function at follow-up of prematurely born infants. *Eur Respir J* 2004 ; 24 : 731-3.

## RÉFÉRENCES

7. McMillen IC, Adams MB, Ross JT, et al. Fetal growth restriction: adaptations and consequences. *Reproduction* 2001 ; 122 : 195-204.
8. Maritz GS, Cock ML, Louey S, Suzuki K, Harding R. Fetal growth restriction has long-term effects on postnatal lung structure in sheep. *Pediatr Res* 2004 ; 55 : 287-95.
9. Wignarajah D, Cock ML, Pinkerton KE, Harding R. Influence of intrauterine growth restriction on airway development in fetal and postnatal sheep. *Pediatr Res* 2002 ; 51 : 681-8.
10. Diaz V, Lebras-Isabet MN, Denjean A. Effect of Nomega-nitro-L-arginine methyl ester-induced intrauterine growth restriction on postnatal lung growth in rats. *Pediatr Res* 2005 ; 58 : 557-61.
11. Rozance PJ, Seedorf GJ, Brown A, et al. Intrauterine growth restriction decreases pulmonary alveolar and vessel growth and causes pulmonary artery endothelial cell dysfunction in vitro in fetal sheep. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011 ; 301 : L860-71.
12. Joss-Moore LA, Wang Y, Baack ML, et al. IUGR decreases PPARgamma and SETD8 Expression in neonatal rat lung and these effects are ameliorated by maternal DHA supplementation. *Early Hum Dev* 2010 ; 86 : 785-91.
13. Joss-Moore LA, Wang Y, Yu X, et al. IUGR decreases elastin mRNA expression in the developing rat lung and alters elastin content and lung compliance in the mature rat lung. *Physiol Genomics* 2011 ; 43 : 499-505.
14. Cock ML, Joyce BJ, Hooper SB, et al. Pulmonary elastin synthesis and deposition in developing and mature sheep: effects of intrauterine growth restriction. *Exp Lung Res* 2004 ; 30 : 405-18.
15. Perros F, Humbert M, Cohen-Kaminsky S. Hypertension artérielle pulmonaire : un parfum d'auto-immunité. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 607-16.

## NOUVELLE

### À propos du développement cérébral des prématurés

François Rousseau<sup>1</sup>, Nadine Girard<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>ICube, UMR 7357, université de Strasbourg, CNRS, 300, boulevard Sébastien Brant, 67412 Illkirch, France ;

<sup>2</sup>Centre de résonance magnétique biologique et médicale (CRMBM), UMR 7339, université Aix-Marseille, CNRS, 13005 Marseille, France ;

<sup>3</sup>Hôpital la Timone, université de la Méditerranée, 13005 Marseille, France.

[rousseau@unistra.fr](mailto:rousseau@unistra.fr)

➤ Chaque année, environ 10 % des bébés dans le monde naissent prématurément (soit avant 37 semaines d'aménorrhée). La prématurité est la principale cause de décès chez les nouveau-nés et un nombre conséquent de ceux qui survivent souffrent d'incapacité à vie, notamment concernant l'apprentissage, la vision ou l'audition (rapport *Born too soon* de l'Organisation mondiale de la santé [OMS] paru en 2012<sup>1</sup>). Les progrès réalisés dans la prise en charge de ces enfants ont contribué à améliorer la survie des grands prématurés. Cependant, l'étude EPIPAGE (enquête épidémiologique sur les petits âges gestationnels), lancée en France en 1997, a montré que 42 % des enfants nés entre 24 et 28 semaines d'âge gestationnel et 31 % de ceux qui sont nés entre 29 et 32 semaines ont besoin d'une prise en charge médicale spécialisée spécifique pendant les 5 premières années, contre 16 % de ceux qui sont nés à terme [1]. Il est difficile de prévoir les risques neurologiques que courent les prématurés survivants

à long terme, ce qui souligne l'importance d'approfondir nos connaissances sur l'impact d'une naissance prématurée sur le développement cérébral.

#### Des moyens limités d'étude du développement cérébral

Le développement du cerveau suit une succession d'étapes régies par une interaction complexe entre des milliers de gènes et des facteurs environnementaux. Connaître le déroulement temporel exact de ces événements en situation normale permettrait de mieux appréhender les mécanismes à l'origine des séquelles provoquées par des altérations de ce développement lors de la prématurité, et donc de mieux adapter les techniques de prise en charge des prématurés. De multiples processus neurobiologiques interviennent dans la plage temporelle correspondant à une naissance prématurée (de 24 à 37 semaines d'aménorrhée) : migration neuronale, bourgeonnement dendritique, formation des synapses, prolifération des cellules gliales, apoptose neuronale, etc. [2].

Étudier un phénomène aussi complexe que la maturation cérébrale est délicat. Les investigations *post-mortem* per-

mettent d'obtenir des informations à des échelles très fines, mais elles ont une portée réduite car elles sont limitées à une anatomie (souvent pathologique) analysée à un instant précis du développement. Les informations concernant l'aspect fonctionnel ainsi que la dynamique du développement sont perdues. Les études chez l'animal permettent de s'affranchir de ces limites mais l'extrapolation des résultats observés chez un animal au cerveau humain peut être délicate. Les techniques d'imagerie non invasives, telles que l'échographie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'électro-encéphalographie (EEG) et la magnéto-encéphalographie (MEG) permettent, de façon complémentaire, d'étudier *in vivo* le cerveau à ce stade du développement au niveau anatomique et fonctionnel, ainsi que les dynamiques temporelles associées.

Dans ce contexte, l'IRM de diffusion est une technique d'imagerie prometteuse car elle permet d'estimer en chaque point du cerveau la distribution des directions de diffusion des molécules d'eau. En supposant que cette diffusion soit principalement contrainte par les fibres nerveuses, il est alors possible

<sup>1</sup> Le rapport peut être téléchargé à l'adresse suivante : [http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/preterm\\_birth\\_report/en/](http://www.who.int/pmnch/media/news/2012/preterm_birth_report/en/)

**Mots clés (français) :**

Anomalies de l'alvéolisation

Dysplasie Broncho-Pulmonaire

Prééclampsie

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

Puces d'expression à ARN

Retard de Croissance Intra-Utérin

**Keywords :**

Bronchopulmonary dysplasia

Chronic lung disease

Impaired alveolarization

Intrauterine growth restriction

Microarray analysis

Preeclampsia

Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

## Résumé

Une croissance intra-utérine insuffisante représente, avec la prématurité et les malformations congénitales, une des principales causes de morbidité et de mortalité néonatales. Ces pathologies sont liées entre elles, les nouveau-nés prématurés étant souvent atteints de RCIU (RCIU). Les études épidémiologiques récentes ont montré que le RCIU était associé à une augmentation de la morbidité respiratoire dès la période néonatale, avec, en particulier, une augmentation du risque de dysplasie broncho-pulmonaire (DBP), principale séquelle respiratoire de la prématurité. La DBP est caractérisée par des anomalies du développement alvéolaire et vasculaire, considérées comme les conséquences d'agressions multiples sur un poumon immature. La physiopathologie exacte reste encore largement méconnue. Nous nous sommes intéressés dans ce travail au lien entre RCIU et DBP avec un abord expérimental et clinique.

Alors que les études épidémiologiques sont relativement concordantes sur le lien entre RCIU et DBP, les études expérimentales, montrent des résultats divers tant sur le développement pulmonaire qu'au niveau moléculaire. Nous avons donc voulu identifier, dans un premier temps, un modèle de RCIU reproduisant les anomalies du développement alvéolaire observées chez l'Homme en utilisant trois modèles précédemment validés chez le rat : un modèle de restriction protidique per-gestationnelle, un modèle de ligature unilatérale de l'artère utérine, un modèle d'injection d'un inhibiteur chimique de la NO synthase, le L-NAME. Seule la restriction protidique anténatale permet de reproduire à long terme des lésions de l'alvéolisation proches de celles observées dans la DBP. En revanche, dans ce modèle, les modifications des principaux gènes identifiés précédemment dans les anomalies du développement alvéolaire ne sont pas observées, que ce soit avant, pendant ou après l'alvéolisation. Ce résultat nous a amené à entreprendre une étude multigénique qui a permis d'identifier plusieurs voies modifiées pendant l'alvéolisation dans ce modèle. Parmi celles-ci, les gènes impliqués dans la contractilité et l'adhésion cellulaire, l'immunité ou la voie des « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ».

Dans la partie clinique de cette étude, nous avons évalué le risque de DBP chez les extrêmes prématurés atteints de RCIU dont les mères présentaient des signes de pathologie vasculaire de la grossesse (prééclampsie). Cette étude rétrospective unicentrique sur 184 enfants a permis de comparer des enfants atteints de RCIU à des enfants eutrophes pris en charge de manière homogène. Le RCIU d'origine vasculaire multiplie le risque de DBP par 6. Un marqueur précoce de l'évolution vers une DBP est un taux de plaquettes bas à la naissance, évoquant le rôle d'un taux élevé de facteurs anti-angiogéniques circulants. Une étude est en cours pour corrélérer les facteurs anti-angiogéniques circulants présents chez les mères prééclamptiques au devenir respiratoire, en particulier à l'évolution vers une DBP, de leurs nouveau-nés d'âge gestationnel inférieur à 30 semaines d'aménorrhée.

En conclusion, nous avons montré expérimentalement que seule la restriction protidique anténatale chez le rat reproduisait les troubles de l'alvéolisation comparables à ceux observés dans la DBP. De nouvelles voies moléculaires potentiellement impliquées dans les anomalies de l'alvéolisation ont été mises en évidence. Par ailleurs, le rôle de facteurs anti-angiogéniques d'origine maternelle comme facteurs de développement d'une DBP est en cours d'évaluation.